



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 179 034** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **A 61 K 38/47, 48/00, C 12 N**
9/40

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 99107287/14, 12.09.1997
(24) Дата начала действия патента: 12.09.1997
(30) Приоритет: 13.09.1996 US 08/712,614
(46) Дата публикации: 10.02.2002
(56) Ссылки: FR 2619719 A, 23.03.1989. FR 2520121 A, 22.07.1987. DE 3715485 os, 17.11.1988.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 13.04.1999
(86) Заявка РСТ: US 97/16603 (12.09.1997)
(87) Публикация РСТ: WO 98/11206 (19.03.1998)
(98) Адрес для переписки: 129010, Москва, ул. Б. Спасская 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", Лебедевой Н.Г.

(71) Заявитель: ТРАНСКАРИОТИК ТЕРАПИЗ, ИНК. (US)
(72) Изобретатель: СЕЛДЕН Ричард Ф. (US), БОРОВСКИ Марианн (US), ДЖИЛЛСПАЙ Фрэнсис П. (US), КИНОСИТА Кэрол М. (US), ТРЕКО Дуглас А. (US), УИЛЛЬЯМС Мелани Д. (US)
(73) Патентообладатель: ТРАНСКАРИОТИК ТЕРАПИЗ, ИНК. (US)
(74) Патентный поверенный: Лебедева Наталья Георгиевна

(54) ЛЕЧЕНИЕ В СЛУЧАЕ ДЕФИЦИТА α -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ А

(57) Изобретение относится к области медицины, в частности к лечению заболеваний, связанных с дефицитом α -галактозидазы А (α -гал А). Сущность изобретения составляет способ лечения пациента, имеющего дефицит α -гал А, который включает введение пациенту человеческой клетки, генетически

модифицированной для сверхэкспрессии и секреции человеческой α -гал А. Изобретение включает также молекулу ДНК, кодирующую полипептиз, содержащий α -гал А, способ очистки и терапевтическую композицию. Техническим результатом является расширение арсенала средств для лечения патологии, связанной с дефицитом α -гал А. 8 с. и 4 з.п. ф-лы, 13 ил., 8 табл.

RU 2 179 034 C2

RU 2 179 034 C2



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 179 034** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 38/47, 48/00, C 12 N 9/40**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 99107287/14, 12.09.1997
 (24) Effective date for property rights: 12.09.1997
 (30) Priority: 13.09.1996 US 08/712,614
 (46) Date of publication: 10.02.2002
 (85) Commencement of national phase: 13.04.1999
 (86) PCT application:
 US 97/16603 (12.09.1997)
 (87) PCT publication:
 WO 98/11206 (19.03.1998)
 (98) Mail address:
 129010, Moskva, ul. B. Spasskaja 25, str.3,
 OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
 Partnery", Lebedevoj N.G.

(71) Applicant:
 TRANSKARIOTIK TERAPIZ, INK. (US)
 (72) Inventor: SELDEN Richard F. (US),
 BOROVSKI Mariann (US), DZHILLSPAJ Frehnsis
 P. (US), KINOSITA Kehrol M. (US), TREKO
 Duglas A. (US), UILL'JaMS Melani D. (US)
 (73) Proprietor:
 TRANSKARIOTIK TERAPIZ, INK. (US)
 (74) Representative:
 Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) **METHOD TO TREAT α -GALACTOSIDASE A DEFICIENCY**

(57) Abstract:
 FIELD: medicine, pathology. SUBSTANCE:
 the method deals with patients
 suffering α -galactosidase A (gal A)
 deficiency. Patient is introduced with a
 human cell genetically modified for

superexpression and secretion of human α -gal
 A. The method, also, includes
 polypeptisis-coding DNA molecule which
 contains α -gal A, purification method and
 therapeutic composition. EFFECT: higher
 efficiency of therapy. 12 cl, 13 dwg, 7 tbl

RU 2 179 034 C2

RU 2 179 034 C2

Предпосылки создания изобретения
Изобретение относится к α -галактозидазе
А и лечению в случае
дефицита α -галактозидазы А.

Болезнь Фабри представляет болезнь,
5 связанную с X-хромосомным унаследованным
лизосомным накоплением,
характеризующуюся такими симптомами, как
тяжелая почечная недостаточность,
ангиокератомы и сердечно-сосудистые
10 нарушения, в том числе гипертрофия
желудочков сердца и недостаточность
митрального клапана. Болезнь также поражает
периферическую нервную систему, вызывая
мучительные приступы со жгучей болью в
15 конечностях. Болезнь Фабри вызывается
дефицитом фермента α -галактозидазы А
(α -гал А), который проявляется в блокировке
катаболизма нейтральных
гликосфинголипидов и накоплением
20 ферментного субстрата церамид-тригексозида
внутри клеток и в кровотоке.

Вследствие характера, связанного с X-
хромосомой унаследованного заболевания, по
существу, все пациенты с болезнью Фабри
являются мужчинами. Хотя наблюдали
несколько случаев тяжелого поражения
25 женских гетерозигот, женские гетерозиготы
обычно или бессимптомны, или имеют
относительно умеренные симптомы,
ограниченные большей частью характерным
помутнением роговицы. Нетипичный вариант
болезни Фабри, при котором проявляется
30 низкая остаточная активность α -гал А и
весьма умеренные симптомы или явное
отсутствие симптомов, характерных для
болезни Фабри, коррелирует с гипертрофией
левого желудочка и болезнью сердца (Nakano
et al. *New Engl. J. Med.*, 333:288-293,
1995). Сделано предположение, что
редукция α -гал А может являться причиной
таких нарушений в работе сердца.

Выделены и секвенированы кДНК и ген,
кодирующий человеческую α -гал А (Bishop
et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:4859,
1986; Kornreich et al., *Nuc. Acids Res.*,
17:3301, 1988; Oeltjen et al. *Mammalian*
35 *Genome*, 6:335-338, 1995).
Человеческая α -гал А экспрессируется в
виде полипептида из 429 аминокислот, из
которых 31 N-концевая аминокислота
составляет сигнальный пептид. Человеческий
фермент экспрессирован в клетках яичника
китайского хомячка (CHO) (Desnick, патент
США N 5356804; Ioannou et al., *J. Cell*
40 *Biol.*, 119: 1137, 1992); в клетках насекомых
(Calhoun et al., патент США N 5179023) и в
COS-клетках (Tsuji et al., *Eur. J. Biochem.*,
165:275, 1987). Сообщается о пробных
испытаниях по применению белка,
полученного из тканей человека, при α -гал А
заместительной терапии (Mapes et al.,
55 *Science*, 169:987, 1970; Brady et al., *N. Engl. J. Med.*, 289:9, 1973; Desnick et al.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5326, 1979),
но на сегодняшний день эффективного
способа лечения болезни Фабри не
существует.

Краткое изложение сущности изобретения
Обнаружено, что при экспрессии ДНК,
кодирующей человеческую α -гал А, в
культивированных человеческих клетках
60 продуцируется полипептид, который
соответствующим образом гликозилирован,

так что он не только ферментативно активен и
способен действовать на
гликосфинголипидный субстрат,
накапливающийся при болезни Фабри, но он
также эффективно поглощается клетками
5 через рецепторы на поверхности клетки,
которые его точно нацеливают туда, где они
необходимы при этой болезни: в лизосомный
компаратмент пораженных клеток, в частности
эндотелиальных клеток, выстилающих
10 кровеносные сосуды пациента. Это открытие,
подробнее обсуждаемое ниже, означает, что
индивидуума с подозрением на
дефицит α -гал А, как при болезни Фабри,
можно лечить или (1) человеческими
15 клетками, которые генетически
модифицированы для сверхэкспрессии и
секреции человеческой α -гал А, или (2)
очищенной человеческой α -гал А, полученной
из культивированных, генетически
модифицированных человеческих клеток.

Терапия по первому пути, т. е. с самими
модифицированными клетками, включает
генетическую манипуляцию с человеческими
клетками (например, первичными клетками,
вторичными клетками или
25 иммортализованными клетками) *in vitro* или *ex vivo*,
чтобы побудить клетки к экспрессии и
секреции большого количества
человеческой α -гал А, с последующей
имплантацией клеток пациенту, что в общих
чертах описано в WO 93/09222, Selden et al.
(включенной в настоящее описание в качестве
30 ссылки).

Когда клетки должны быть генетически
модифицированными для целей лечения
болезни Фабри или посредством генной
терапии, или посредством заместительной
терапии ферментами, ДНК-молекула,
35 содержащая кДНК α -гал А, или
последовательность геномной ДНК может
содержаться в экспрессирующей конструкции
и может быть введена в первичные или
вторичные человеческие клетки (например, в
40 фибробласты, эпителиальные клетки, включая
эпителиальные клетки молочной железы и
кишечника, эндотелиальные клетки,
форменные элементы крови, включая
лимфоциты и клетки костного мозга,
глиальные клетки, гепатоциты, кератиноциты,
мышечные клетки, невральные клетки или в
предшественников клеток таких типов)
50 посредством стандартных способов
трансфекции, в том числе, но не только
перечисленными способами, липосомо-,
полибрен- или DEAE-декстранопосредованной
трансфекцией, электропорацией, осаждением
фосфатом кальция, микроинъекцией или
быстрыми частицами с управляемой
60 скоростью ("биолистики" ["biolistics"]). С
другой стороны, можно использовать систему,
которая доставляет ДНК с помощью вирусного
вектора. Вирусами, известными как пригодные
для переноса генов, являются аденовирусы,
аденоассоциированный вирус, вирус герпеса,
вирус паротита, полиовирус, ретровирусы,
вирус Синдбиса и вирус осповакцины, такой
как вирус чумы канареек. Хотя для способов
лечения данного изобретения
предпочтительны культуры первичных или
вторичных клеток, можно также использовать
иммортализованные человеческие клетки.
Примерами линий иммортализованных
человеческих клеток, полезных в способах
настоящего изобретения, являются, но не

ограничиваются перечисленным, клетки меланомы Bowes (ATCC, инвентарный N CRL 9607), клетки Дауди (ATCC, инвентарный N CCL 213), клетки HeLa и производные клеток HeLa (ATCC, инвентарные NN CCL 2, CCL 2.1 и CCL 2.2), клетки HL-60 (ATCC, инвентарный N CCL 240), клетки HT1080 (ATCC, инвентарный N CCL 121), клетки Юрката (ATCC, инвентарный N TIB 152), клетки карциномы KB (ATCC, инвентарный N CCL 17), лейкозные клетки K-562 (ATCC, инвентарный N CCL 243), клетки рака молочной железы MCF-7 (ATCC, инвентарный N BTH 22), клетки MOLT-4 (ATCC, инвентарный N 1562), клетки Намальвы (ATCC, 1 инвентарный N CRL 1432), Raji-клетки (ATCC, инвентарный N CCL 86), клетки RPMI 8226 (ATCC, инвентарный N CCL 155), клетки U-937 (ATCC, инвентарный N CRL 1593), клетки 2R4 сублинии WI-38VA13 (ATCC, инвентарный N CLL 75.1) и клетки карциномы яичника 2780AD (Van der Blick et al. Cancer Res. , 48:5927-5932, 1988), а также гетерогрибридные клетки, полученные путем слияния человеческих клеток и клеток другого вида. Штаммы вторичных фибробластов человека, такие как WI-38 (ATCC, инвентарный N CCL 75) и MRC-5 (ATCC, инвентарный N CCL 171), также можно использовать.

Методами генной инженерии из человеческих клеток с ДНК-молекулой, кодирующей α -гал А (или посредством другой подходящей генетической модификации, как описано ниже), для получения клетки, которая сверхэкспрессирует и секретирует α -гал А, можно генерировать клональный клеточный штамм, состоящий, по существу, из множества генетически идентичных культивируемых первичных человеческих клеток, или, когда клетки иммортализованы, клональную клеточную линию, состоящую, в основном, из множества генетически идентичных иммортализованных человеческих клеток. Предпочтительно клетки клонального клеточного штамма или клональной клеточной линии являются фибробластами.

Затем можно получить генетически модифицированные клетки и ввести их пациенту подходящими способами, например так, как описано в WO 93/09222, Selden et al.

Генная терапия по изобретению обладает рядом преимуществ по сравнению с ферментно-заместительной терапией с применением фермента, полученного из тканей человека или животного. Например, способ по изобретению не зависит от возможно неустойчивой доступности источников соответствующих тканей и поэтому является коммерчески осуществимым способом лечения дефицита α -гал А. Он относительно безопасен по сравнению с ферментно-заместительной терапией с ферментом, полученным из человеческих тканей, которые могут быть инфицированы известными или неизвестными вирусами и другими инфицирующими агентами. Кроме того, генная терапия по изобретению обладает рядом преимуществ перед ферментно-заместительной терапией в целом. Например, способ изобретения (1) дает преимущества стратегии длительного лечения, исключая необходимость ежедневных инъекций; (2) исключает экстремальные колебания в концентрациях в сыворотке и тканях терапевтического белка, которые типично сопровождают обычную

фармакологическую доставку; и (3) является, вероятно, менее дорогостоящим, чем ферментно-заместительная терапия, поскольку нет необходимости в получении и очистке белка для частого введения.

5 Как описано выше, индивидуумов с дефицитом α -гал А можно также лечить очищенной α -гал А (т.е. ферментно-заместительной терапией).
 10 Первичные, вторичные и иммортализованные человеческие клетки, генетически модифицированные для сверхэкспрессии человеческой α -гал А, также полезны в случае получения белка *in vitro* для получения белка, который можно очистить для ферментно-заместительной терапии.
 15 Вторичные или иммортализованные человеческие клетки можно выбрать среди клеток, описанных выше, и можно генетически модифицировать методами трансфекции или трансдукции, также описанными выше. После генетической модификации клетки культивируют в условиях, допускающих сверхэкспрессию и секрецию α -гал А. Белок выделяют из выращенных клеток, собирая среду, в которой выращивают клетки, и/или путем растворения клеток для высвобождения их содержимого и затем применяют стандартные методы очистки белков. Один из таких методов заключается в пропускании культуральной среды или любого образца, содержащего человеческую α -гал А, через гидрофобную, вступающую во взаимодействие смолу, такую как бутилсефароза[®], или другую смолу с функциональной группой, содержащей бутильную группу. Пропускание образца через такую смолу может составлять первую стадию хроматографии. Если необходима дополнительная очистка, содержащий α -гал А материал, элюированный из гидрофобной активной смолы, можно загрузить в колонку, содержащую другую смолу, например иммобилизованную гепариновую смолу, такую как гепаринсефароза[®], гидроксипатит, анионообменную смолу, такую как Q-сефароза[®], или смолу для гельхроматографии, такую как супердекс[®] 200. Предпочтительно, схема очистки включает применение каждой смолы из вышеуказанных типов смол. С другой стороны, можно применить одну или несколько из последних смол перед применением гидрофобной активной смолы или вместо нее.
 45 Ранее описанные способы получения α -гал А относительно высокой чистоты зависят от применения аффинной хроматографии с использованием сочетания аффинной хроматографии на лецитине (конканавалин А-(Con A)-сефароза) и аффинной хроматографии, основанной на связывании α -гал А с аналогом субстрата N-6-аминогесаноил - α -D-галактозиламином, связанным с сефарозной матрицей (Bishop et al. , J. Biol. Chem., 256:1307-1316, 1981).
 55 Применение белковых лецитинаффинных смол и смол - аналогов субстрата типично связывается с непрерывным "сползанием" аффинного агента с твердого носителя (ср. Marikar et al. , Anal. Biochem. , 201: 306-310, 1992), что приводит, в результате, к загрязнению очищенного продукта аффинным агентом или свободным в растворе

или связанным с элюированным белком. Такие загрязнения делают продукт непригодным для применения в фармацевтических препаратах. Связанные аналоги субстрата и лецитины также могут весьма негативно влиять на ферментативные, функциональные и структурные свойства белков. Кроме того, такие аффинные смолы обычно дорогостоящи для получения, что делает применение таких смол менее подходящим для производства в коммерческом масштабе, чем более привычных смол для хроматографии. Таким образом, разработка схемы очистки с использованием традиционных смол для хроматографии, которые легко доступны для поставок и качественно подходящи для крупномасштабного коммерческого применения, является существенным преимуществом настоящего изобретения.

Индивидуума, у которого подозревают дефицит α -гал А, можно лечить путем введения фармацевтически приемлемой очищенной человеческой α -гал А стандартным способом, в том числе, но не только, внутривенной, подкожной или внутримышечной инъекцией, или в виде твердого имплантата. Очищенный белок можно ввести в терапевтическую композицию, состоящую из водного раствора, содержащего физиологически приемлемый эксципиент, например носитель, такой как сывороточный альбумин человека, при pH 6,5 или ниже.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу получения больших количеств подходящим образом гликозилированной и поэтому терапевтически полезной, человеческой α -гал А. Это делает ферментно-заместительную терапию в случае дефицита α -гал А коммерчески жизнеспособной, а также относительно безопасной по сравнению с терапией ферментом, полученным из тканей человека или животного.

Специалистам в этой области техники будет понятно, что последовательность ДНК человеческой α -гал А (или кДНК, или геномной ДНК) или последовательности, которые отличаются от нее либо из-за изменений молчащих кодонов, либо изменений кодонов, которые дают консервативные замещения аминокислот, можно использовать для генетической модификации культивированных человеческих клеток, так что они будут сверхэкспрессировать и секретировать фермент. Также возможно, что некоторые мутации в последовательности α -гал А будут кодировать полипептиды, которые возвращают или обнаруживают повышенную ферментативную активность α -гал А (что можно будет выявить путем экспрессии молекулы мутантной ДНК в культивированных клетках, очистки кодированного полипептида и измерения каталитической активности, как описано здесь). Например, можно ожидать, что консервативные замещения аминокислот оказывают слабое действие или не оказывают действия на биологическую активность, особенно если они составляют менее 10% от общего числа остатков в белке. Консервативные замещения обычно включают замещения в пределах следующих групп: глицин, аланин; валин, изолейцин, лейцин;

аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота; аспарагин, глутамин; серии, треонин; лизин, аргинин; и фенилаланин, тирозин.

5 Продуцирование α -гал А клетками можно привести к максимуму путем некоторых генетических манипуляций. Например, молекула ДНК, которая кодирует α -гал А, может также кодировать гетерологичный сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид человеческого гормона роста (hGH), эритропоэтина, фактора VIII, фактора IX, глюкогона, рецептора для липопротеина 10 низкой плотности (LDL), или лизосомного фермента, иного чем α -гал А. Предпочтительно, сигнальный пептид 15 представляет сигнальный пептид hGH (ПОСЛЕД. N21) и находится в N-конце кодированного белка.

ДНК-последовательность, кодирующая 20 сигнальный пептид, может содержать интрон, такой как первый интрон hGH-гена, результатом чего является такая ДНК-последовательность, как ПОСЛЕД. N 27 (см. также фиг. 10). Кроме того, молекула ДНК может также содержать 3'-нетранслируемую последовательность (UTS), 25 которая составляет в длину по меньшей мере 6 нуклеотидов (в противоположность мРНК α -гал А, обнаруженной у людей, у которой нет 3' UTS, причем требуемый сайт полиаденилирования находится в пределах кодирующей последовательности). UTS 30 располагается сразу же 3' к терминирующему кодону кодирующей последовательности и включает сайт полиаденилирования. Она составляет в длину, предпочтительно, по 35 меньшей мере 6 нуклеотидов, предпочтительнее - по меньшей мере 12, а наиболее предпочтительно - по меньшей мере 30 нуклеотидов, и во всех случаях она содержит последовательность AATAAA или родственную последовательность, которая 40 служит для промоторования полиаденилирования. Описанная молекула ДНК, т.е. кодирующая сигнальный пептид hGH, связанный с α -гал А, и содержащая 3' UTS, которая включает сайт полиаденилирования, и, предпочтительно, содержащая 45 экспрессирующие регулярные последовательности, также входит в объем изобретения. Также в объем изобретения входит молекула ДНК, кодирующая белок, которая содержит сигнальный пептид hGH, связанный с α -гал А или любым другим гетерологичным полипептидом (т. е., любым полипептидом, иным чем hGH, или аналогом hGH). Гетерологичный полипептид типично 50 представляет белок млекопитающего, например любой, подходящий с медицинской точки зрения человеческий полипептид.

Другие особенности и преимущества 55 данного изобретения станут очевидны из последующего подробного описания и из формулы изобретения.

Используемый здесь термин "генетически модифицированная" в отношении клеток охватывает клетки, которые экспрессируют 60 определенный генный продукт после введения молекулы ДНК, кодирующей данный генный продукт и/или регуляторные элементы, которые регулируют экспрессию кодирующей последовательности. Введение молекулы ДНК можно осуществить с помощью направленной генной доставки (т.е. введения молекулы ДНК

в определенный участок генома); кроме того, гомологичная рекомбинация допускает замену самого дефектного гена (дефектный ген α -гал А или его часть можно заменить при болезни Фабри собственными клетками пациента с целым геном или его частью).

Используемый здесь термин " α -гал А" относится к α -гал А без сигнального пептида, т. е. к ПОСЛЕД. N 26 (фиг. 9). Есть определенные признаки, что остатки 371-398 или 373-398 ПОСЛЕД. 26 (фиг. 9) в лизосоме можно удалить; однако считается, что удаление этого предполагаемого пропептида не влияет на активность фермента. Это приводит к мысли, что можно удалить любую часть предполагаемого пропептида без ухудшения активности. Таким образом, используемый здесь термин " α -гал А" также охватывает белок с последовательностью, соответствующей ПОСЛЕД. N 26, за исключением недостающих остатков (до 28) у С-конца этой последовательности.

"Дефицит α -гал А" означает любую недостаточность количества или активности этого фермента у пациента. Такой дефицит может вызвать тяжелые симптомы, которые обычно наблюдаются у мужчин, страдающих от болезни Фабри, или он может быть только частичным и вызывать относительно умеренные симптомы, что можно наблюдать у гетерозиготных женских носителей дефектного гена.

Используемый здесь термин "первичная клетка" включает клетки, присутствующие в суспензии клеток, выделенных из источника - ткани позвоночного (до того, как их высевают, т.е., связывают с подложкой для тканевой культуры, такой как чашка или колба), клетки, присутствующие в эксплантате, полученном из ткани, оба предыдущих типа клеток, высеянные в первый раз, и клеточные суспензии, полученные из этих высеянных клеток.

"Вторичными клетками" называются клетки на всех последующих стадиях культивирования. Иначе, высеянную первый раз первичную клетку удаляют с культурального субстрата и высевают снова (пересевают), и эта клетка, как и все клетки при последующих пересевах, называется вторичной клеткой.

"Клеточный штамм" состоит из вторичных клеток, которые пересеивали один или несколько раз, которые показывают конечное число среднего удвоения популяций в культуре, показывают свойство угнетаемого контактом роста на "якорной подложке (за исключением клеток, разведенных в суспензионной культуре) и не являются иммортализованными.

"Иммортализованной клеткой" обозначают клетку из установленной клеточной линии, которая обнаруживает явно неограниченную продолжительность жизни в культуре.

"Сигнальный пептид" означает пептидную последовательность, которая направляет вновь синтезированный полипептид, с которым он связывается к эндоплазматическому ретикулуму для дальнейшего посттрансляционного процессирования и/или распределения.

Используемый здесь в контексте с α -гал А термин "гетерологичный сигнальный пептид" относится к сигнальному пептиду, который не

является сигнальным пептидом человеческой α -гал А (т.е., который кодируется нуклеотидами 36-128 ПОСЛЕД. N 18). Типично, он представляет сигнальный пептид какого-то другого белка млекопитающего, но не α -гал А.

Термин "первая стадия хроматографии" относится к первому внесению образца в хроматографическую колонку (все стадии, связанные с получением образца, исключены).

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 изображен зонд в 210 п.о., который используют для выделения α -гал А из библиотеки кДНК фибробластов 13 человека (ПОСЛЕД. N 19). Последовательность состоит из экзона 7 гена α -гал А. Зонд выделяют из геномной ДНК человека посредством полимеразной цепной реакции (PCR). Участки, подчеркнутые на чертеже, соответствуют последовательностям затравок для амплификации.

На фиг. 2 представлена последовательность ДНК-фрагмента, который завершает 5'-конец клон кДНК α -гал А (ПОСЛЕД. N 20). Этот фрагмент амплифицируют посредством PCR из геномной ДНК человека. Подчеркнутые участки соответствуют последовательностям затравок для амплификации. Также показаны положения сайтов рестрикции эндонуклеазами NcoI и SacII, которые используют для субклонирования, как описано в примере 1А.

На фиг. 3 представлена последовательность кДНК α -гал А, включающая последовательность, кодирующую сигнальный пептид (ПОСЛЕД. N 18).

На фиг. 4 приводится схематическая карта рХАГ-16 - конструкции, экспрессирующей α -гал А, которая включает промотор CMV (цитомегаловирус) и интрон, кодирующую последовательность сигнального пептида hGH и первый интрон, кДНК α -гал А (т.е., не имеющую последовательности сигнального пептида α -гал А) и 3' UTS hGH.

На фиг. 5 приводится схематическая карта рХАГ-28 - конструкции, экспрессирующей α -гал А, которая включает коллагеновый промотор I α 2, интрон β -актина, кодирующую последовательность сигнального пептида hGH и первый интрон, кДНК α -гал А (т.е., не имеющую последовательности сигнального пептида α -гал А) и 3' UTS hGH.

На фиг. 6 приводится хроматограмма стадии очистки α -гал А с использованием смолы бутилсефарозы®. Показаны поглощение при 280 нм (ровная линия) и активность α -гал А (линия с точками) выделенных фракций.

Фиг. 7 представляет графическое отображение фибробластами Фабри человеческой α -гал А, полученной согласно изобретению. Внутриклеточную активность α -гал А и общую концентрацию белка измеряют после инкубации клеток с возрастающими концентрациями человеческой α -гал А, полученной по изобретению. Показаны влияние потенциальных ингибиторов интернализации маннозо-6-фосфата (М6Р; незаштрихованные ромбы)

и маннана (незаштрихованные кружки).

Фиг. 8 представляет схему

экспериментальной системы, созданной для исследования фибробластов Фабри после поглощения α -гал А. Активность α -гал А клеток Фабри измеряют после воздействия или обычных, или сверхэкспрессирующих α -гал А фибробластов человека, выращенных во вставках Transwel™. "M6P" = маннозо-6-фосфат; "нтрф. ФЧ" = нетрансфектированные фибробласты человека; "BRS11" = трансфектированный сверхэкспрессирующий α -гал А штамм фибробластов.

На фиг. 9 приводится аминокислотная последовательность человеческой α -гал А (ПОСЛЕД. N 26).

На фиг. 10 приводится ДНК-последовательность, кодирующая сигнальный пептид hGH и содержащая первый интрон hGH (подчеркнут) (ПОСЛЕД. N 27).

На фиг. 11 приводится ДНК-последовательность, кодирующая сигнальный пептид hGH, без интрона (ПОСЛЕД. N 22).

На фиг. 12 приводится аминокислотная последовательность сигнального пептида hGH (ПОСЛЕД. N 21).

На фиг. 13 приводится кДНК-последовательность, кодирующая человеческую α -гал А (без сигнального пептида) (ПОСЛЕД. N 25).

Подробное описание изобретения
Лизосомные ферменты, такие как α -гал А, направляются к лизосомному компартменту клетки через взаимодействие с маннозо-6-фосфатным (M6P) рецептором, который связывает остатки M6P, присутствующие в олигосахаридных частях ферментов, предназначенных для лизосомного компартмента (Kornfeld, S. and Mellman I., Ann. Rev. Cell Biol., 5:483-525, 1989). Первичное взаимодействие происходит в аппарате Гольджи, где ферменты, связанные с рецепторами для M6P аппарата Гольджи, расщепляются для переноса к лизосомам. Полагают, что на поверхности клетки имеет место вторичный тип взаимодействия между внеклеточной α -гал А и M6P-рецепторами. Внеклеточные вещества, поглощенные клетками, переносятся через цитоплазму в эндоцитических пузырьках, и сливаются с первичными лизосомами, и выливают их содержимое в лизосомы. В этом процессе M6P-рецепторы поверхности клеток также включаются в эндоцитические пузырьки и переносятся к лизосомам.

Присутствующая во внеклеточной среде α -гал А, если она несет остатки M6P, связываются с M6P-рецепторами на поверхности клеток и за счет этого переносятся в лизосомный компартмент вместе с рецепторами. Фермент в лизосомном компартменте в результате такого пути "утилизации" тотчас может осуществлять свою соответствующую функцию. Таким образом, даже если клетка генетически продуцирует недостаточно своей собственной α -гал А, существует механизм перемещения к ней экзогенно продуцированного фермента при условии, что (а) фермент подходящим образом гликозилирован и (б) дефектная клетка несет рецепторы для M6P.

Показано, что при болезни Фабри васкулярные эндотелиальные клетки почки и

сердца отображают серьезные гистопатологические отклонения от нормы и вносят вклад в клиническую патологию болезни; эти клетки, несущие рецепторы для M6P, представляют собой особую мишень для представленного изобретения. Полученную по изобретению α -гал А можно доставлять к поврежденным клеткам или местно, или системно посредством генной терапии (т.е., с помощью генетически модифицированных клеток, которые экспрессируют и секретируют гликозилированный фермент в организме пациента), или с помощью традиционных фармакологических способов введения. Поэтому α -гал А, в которой в N-связанных олигосахаридах присутствует M6P, имеет большое значение для лечения в соответствии с данным изобретением.

Кроме того, большое значение имеет также степень, до которой посредством сиалилирования модифицированы N-связанные олигосахариды α -гал А. В отсутствие соответствующего сиалилирования α -гал А будет быстро выводиться из кровообращения из-за связывания асиалогликопротеиновыми рецепторами печени с последующим поглощением и расщеплением гепатоцитами (Ashwell and Harford, Ann. Rev. Biochem., 51:531-554, 1982.). Это снижает количество α -гал А, доступной при циркуляции для связывания с M6P-рецепторами на клетках, которые участвуют в клинической патологии болезни Фабри, таких как васкулярные эндотелиальные клетки почки и сердца. К удивлению заявителя обнаружили, что α -гал А, секретируемая устойчиво трансфектированными человеческими клетками, обладает характеристиками гликозилирования, которые подходят для лечения болезни Фабри либо генной терапией, либо посредством традиционного фармацевтического введения очищенного секретируемого белка. Это противоположно ситуации с наиболее хорошо исследованным лизосомным ферментом глюкоцереброзидазой, когда доставка к клинически соответствующим клеткам организма фермента, очищенного от человеческой плаценты или выделенного из трансфектированных CHO-клеток, требует сложной ферментной модификации фермента после очистки (ср. Beutler, New Engl. J. Med., 325:1354-1360, 1991).

Лечение по изобретению можно осуществить двумя основными путями: посредством введения пациенту терапевтически эффективного количества очищенной человеческой α -гал А, полученной из культивированных человеческих клеток, генетически модифицированных для сверхэкспрессии и секреции фермента, или путем введения пациенту самой сверхэкспрессирующей клетки. Методы осуществления необходимых генетических модификаций описываются ниже, как и способы очистки, составления композиций и лечения.

Пример 1. Получение и применение конструкций, созданных для доставки и экспрессии α -гал А

Конструируют две экспрессирующие плазмиды - pXAG-16 и pXAG-28. Эти плазмиды содержат кДНК человеческой α -гал А,

кодирующую 398 аминокислот фермента α -гал А (без сигнального пептида α -гал А); геномную ДНК-последовательность сигнального пептида человеческого гормона роста (hGH), которая прерывается первым интроном гена hGH; и 3'-нетранслируемую последовательность (UTS) гена hGH, которая содержит сигнал для полиаденилирования. Плазмида pXAG-16 содержит немедленно-ранний промотор цитомегаловируса человека (CMV IE) и первый интрон (фланкированный некодирующими экзонными последовательностями), в то время как pXAG-28 управляется коллагеновым промотором I α 2 и также содержит 5' UTS гена β -актина, которая содержит первый интрон гена β -актина.

А. Клонирование полной кДНК α -гал А и создание экспрессирующей α -гал А плазмиды pXAG-16

Человеческую α -гал А клонируют из кДНК-библиотеки фибробластов человека, которую создают следующим образом. Из полной РНК выделяют мРНК поли-А⁺ и осуществляют синтез кДНК с использованием реагентов для системы лямбда ZapII[®] по указаниям изготовителя (Stratagene Inc., Ла-Джолла, Калифорния). Коротко, "первоцепочечную" кДНК получают посредством обратной транскрипции в присутствии затравки олиго-дТ, содержащей внутренний сайт для рестрикционной эндонуклеазы XhoI. После обработки РНКазой N кДНК "ник"-транспирируют с ДНК-полимеразой I образования двухцепочечной кДНК. У этой кДНК тупят концы T4-ДНК-полимеразой и лигируют с адапторами EcoRI. Продукты этого лигирования обрабатывают T4-ДНК-киназой и расщепляют XhoI. Фракционируют кДНК хроматографией на сефакириле-400[®]. Фракции большого и среднего размера объединяют и лигируют кДНК с расщепленными EcoRI и XhoI плечами лямбда-ZapII. Продукты этого лигирования затем упаковывают и титруют. Первичная библиотека имеет титр 1,2 • 10⁷ бое/мл и средний размер вставки 925 п.о.

Для выделения кДНК используют зонд в 210 п.о. из экзона 7 гена человеческой α -гал А (фиг. 1, ПОСЛЕД. N 19). Сам зонд выделяют из геномной ДНК посредством полимеразной цепной реакции (PCR) с использованием олигонуклеотидов 5'-СТGGGCTGTAGCTATGATAAAC-3' (олиго-1; ПОСЛЕД. 1) и 5'-ТСТАГС-ТГАAGСААААСАГТГ-3" (олиго-2; ПОСЛЕД. N 2). PCR-продукт затем используют для скрининга библиотеки кДНК фибробластов, и выделяют положительные клоны, и характеризуют их далее. Один из положительных клонов фаг 3А "вырезают" по схеме с системой лямбда-ZapII[®] (Stratagene, Inc., Ла-Джолла, Калифорния) по указаниям изготовителя. Такая процедура дает плазмиду pBSAG3A, которая содержит кДНК-последовательность α -гал А в скелете плазмиды pBluescriptSK-TM. Секвенирование ДНК показывает, что эта плазмида не содержит полного 5'-конца кДНК-последовательности. Поэтому 5'-конец реконструируют с использованием PCR-фрагмента, амплифицированного из геномной ДНК человека. Чтобы это

осуществить, фрагмент геномной ДНК в 268 п.о. (фиг. 2, ПОСЛЕД. N 20) амплифицируют с использованием олигонуклеотидов 5'-ATTGGTCCGCCCTGAGGT-3' (олиго-3; ПОСЛЕД. N 3) и 5'-TGATGCAGGAATCTGGCTCT-3'(олиго-4; ПОСЛЕД. N 4). Этот фрагмент субклонировать в клонирующую плазмиду "ТА" (Invitrogen Corp., Сан-Диего, Калифорния), и генерируют плазмиду pTAAGEI. Плазмиду pBSAG3A, которая содержит большую часть кДНК-последовательности α -гал А, и плазмиду pTAAGEI, содержащую 5'-конец кДНК α -гал А, расщепляют каждой с SacII и NcoI. Положения соответствующих сайтов SacII и NcoI в амплифицированном ДНК-фрагменте показаны на фиг. 2. Выделяют из pTAAGEI SacII-NcoI-фрагмент в 0,2 кб и лигируют с эквивалентно расщепленной pBSAG3A. Эта плазмида pAGAL содержит полную кДНК-последовательность α -гал А, включая последовательность, кодирующую сигнальный пептид α -гал А. Полностью секвенируют кДНК (показано на фиг. 3), включая сигнальный пептид α -гал А (ПОСЛЕД. N 18), и обнаруживают, что она идентична опубликованной последовательности кДНК α -гал А (геномная библиотека последовательностей HUMGALA).

Плазмиду pXAG-16 создают через несколько промежуточных этапов следующим образом. Во-первых, pAGAL расщепляют SacII и XhoI и тупят концы. Во-вторых, концы полной кДНК α -гал А лигируют 1 с линкерами XbaI, и субклонировать в гидролизованную с XbaI pEF-BOS (Mizushima et al., Nucl. Acids Res., 18:5322, 1990), и создают pXAG-1. Эта конструкция содержит 3' UTS человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) и промотор человеческого фактора элонгации 1 α (EF-1 α), фланкирующий кДНК, кодирующую α -гал А с добавлением сигнального пептида α -гал А, так что 5'-конец кДНК α -гал А сливается с промотором EF-1 α . Чтобы создать конструкцию с промотором CMV IE и первым интроном, кДНК α -гал А и 3' UTS G-CSF удаляют из pXAG-1 в виде XbaI-BamHI-фрагмента в 2 кб. У фрагмента тупят концы, лигируют его с линкерами BamHI и вставляют в расщепленную BamHI pCMVfipNeo (которую конструируют так, как описано ниже). Ориентация такова, что 5'-конец кДНК α -гал А сливается с промоторной областью CMV IE.

Создают pCMVfipNeo следующим образом. Фрагмент промотора гена CMV IE амплифицируют PCR с использованием геномной ДНК CMV в качестве матрицы и олигонуклеотидов 5'-TTTTGGATCCCTCGAGGACATTGATTATTGAC TAG-3' (ПОСЛЕД. N 23) и 5'-TTTTGGATCCCGTGTCAAGGACGGTGAC-3' (ПОСЛЕД. N 24). Получающийся в результате продукт (фрагмент 1,6 кб) расщепляют BamHI и получают содержащий промотор CMV фрагмент с липкими гидролизованными BamHI концами. Из плазмиды pMCIneoA (Stratagene Inc., Ла-Джолла, Калифорния) выделяют новую экспрессирующую единицу в виде XhoI-BamHI-фрагмента в 1,1 кб. Содержащий промотор CMV и новые фрагменты вставляют в BamHI-, XhoI-расщепленную плазмиду (pUC12). Заметим, что pCMVfipNeo содержит промоторную область CMV 1E, начинающуюся

с нуклеотида 546 и оканчивающуюся на нуклеotide 2105 (из геномной библиотеки последовательностей HS5MIEP), и ген устойчивости к неомицину, управляемый тимидинкиназным промотором вируса простого герпеса (HSV) (ген TKneo), сразу 5' к фрагменту промотора CMV IE. Направление транскрипции неогена такое же, как фрагмента промотора CMV. Промежуточную конструкцию называют рXAG-4.

Чтобы добавить 3' UTS hGH, удаляют 3' UTS GCSF из рXAG-4 в виде XbaI-SmaI-фрагмента и тупят концы рXAG-4. 3' UTS hGH удаляют из рXGH5 (Selden et al., Mol. Cellular Biol., 6:3173- 3179, 1986) в виде SmaI-EcoRI-фрагмента в 0,6 кб. После дефосфорилирования этого фрагмента его лигируют в рXAG-4 сразу после сайта с затупленными XbaI концами рXAG-4. Эту промежуточную конструкцию называют рXAG-7. Из этой плазмиды удаляют TKneo-фрагмент в виде HindIII-ClaI-фрагмента, и концы плазмиды дефосфорилируют посредством "замещения" фрагментом Кленова ДНК- полимеразы 1. Лигируют ген устойчивости к неомицину, управляемый ранним промотором SV40, в виде дефосфорилированного ClaI-BsmBI-фрагмента из гидролизата pcDNeo (Chen et al., Mol. Cellular Biol., 7: 2745-2752, 1987), помещая звено неотранскриптона в той же ориентации, что и транскриптон α -гал А. Эту промежуточную конструкцию называют рXAG-13.

Для завершения конструкции рXAG-16, содержащей кодирующую последовательность сигнального пептида hGH в 26 аминокислот и первый интрон гена hGH, сначала удаляют EcoRI-BamHI-фрагмент в 2,0 кб из рXAG-13. Этот фрагмент содержит кДНК α -гал А и 3' UTS hGH. Этот большой фрагмент заменяют 3 фрагментами. Первый фрагмент состоит из PCR-продукта рXGH5 в 0,3 кб, который содержит кодирующую последовательность сигнального пептида hGH и включает первую интронную последовательность bGH, от синтетического BamHI-сайта, расположенного сразу в обратном направлении от обобщающей последовательности Козака до конца кодирующей последовательности сигнального пептида hGH. Для амплификации этого фрагмента (фрагмента 1) используют олигонуклеотиды

5'-TTTTGGATCCACCATGGCTA-3' (олиго-HGH101; ПОСЛЕД. N 5) и 5'-TTTTGCCGGCACTGCCCTTTGAA-3' (олиго-HGH102; ПОСЛЕД. N 6). Второй фрагмент состоит из PCR-продукта в 0,27 кб, содержащего последовательности, соответствующие началу кДНК, кодирующей фермент α -гал А в 398 аминокислот (т.е., не имеющей сигнального пептида α -гал А), до сайта NheI. Для амплификации этого фрагмента (фрагмента 2) используют олигонуклеотиды

5'-TTTTTCAGCTGGACAATGGATTGGC-3' (олиго-AG10; ПОСЛЕД. N 7) и 5'-TTTTGCTAGCTGGCGAATCC-3' (олиго-AG11; ПОСЛЕД. N 8). Третий фрагмент состоит из NheI-EcoRI-фрагмента рXAG-7, содержащего оставшуюся последовательность α -гал А, а также 3' UTS hGH (фрагмент 3).

Фрагмент 1 (расщепленный BamHI и NaeI), фрагмент 2 (расщепленный PvuII и NheI) и

фрагмент 3 смешивают с BamHI-EcoRI-фрагментом в 6,5 кб рXAG-13, содержащим неоген и промотор CMV 1E, и лигируют вместе с образованием плазмиды рXAG-16 (фиг. 4).

5 Б. Конструирование экспрессирующей α -гал А плазмиды рXAG-28

Промотор коллагена человека $I\alpha 2$ для применения в экспрессирующей α -гал А конструкции рXAG-28 выделяют следующим образом. С использованием олигонуклеотидов 5'-

TTTTGGATCCGTGTCCCATAGTGTTCCTCAA-3' (олиго-72; ПОСЛЕД. N 9) и 5'-TTTTGGATCCGCAGTCGTGGCCAGTACC-3' (олиго-73; ПОСЛЕД. N 10) выделяют PCR-фрагмент геномной ДНК человека в 408 п.о., содержащий часть промотора коллагена человека $I\alpha 2$.

20 Этот фрагмент используют для скрининга библиотеки лейкоцитов человека в EMBL3 (Clontech Inc., Пало-Альто, Калифорния). Выделяют один из положительных клонов (фаг 7H), содержащий EcoRI-фрагмент в 3,8 кб и клонируют в рBSISK+ (Stratagene Inc., Ла-Джолла, Калифорния) в сайте EcoRI (создавая рBS/7H. 2). В рBSISK+ вводят сайт AvrII посредством расщепления с SpeI, который осуществляет расщепление в пределах полилинкера рBSISK+, "вливания" фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I и вставки олигонуклеотида

30 5'-CTAGTCCTAGGA-3' (ПОСЛЕД. N 11). Этот вариант рBSISK+ расщепляют с BamHI и AvrII и лигируют с BamHI-AvrII-фрагментом в 121 п.о. первоначального PCR-фрагмента промотора коллагена $I\alpha 2$ в 408 п.о., описанным выше, и создают рBS/121COL.6. Плазмиду рBS/121COL. 6 расщепляют XbaI, расщепляющим в пределах полилинкерной последовательности рBSISK+, "вливают" фрагментом Кленова ДНК-полимеразы 1 и расщепляют AvrII. Выделяют BamHI-AvrII-фрагмент рBS/7H.2 и дефосфорилируют сайт BamHI посредством обработки ферментом Кленова. Затем фрагмент расщепляют AvrII и лигируют с расщепленным AvrII вектором, и создают, таким образом, плазмиду с коллагеновым промотором рBS/121bpCOL7H.18.

35 Затем коллагеновый промотор сливают с 5' UTS гена человеческого β -актина, содержащей первый интрон гена человеческого β -актина. Чтобы выделить эту последовательность, из геномной ДНК человека выделяют PCR-фрагмент в 2 кб с использованием олигонуклеотидов

40 5'-TTTTGAGCACAGAGCCTCGCCT-3' (олиго-BA 1; ПОСЛЕД. N 12) и 5'-TTTTGGATCCGGTGAGCTGCGAGAATAGCC-3' (олиго-BA2; ПОСЛЕД. N 13).

55 Этот фрагмент расщепляют BamHI и BsiHKAI и высвобождают фрагмент в 0,8 кб, содержащий 5' UTS β -актина и интрон. Затем из плазмиды с коллагеновым промотором рBS/121bpCOL7H.18 выделяют Sall-SrfI-фрагмент с 3,6 кб следующим образом. Частично расщепляют

60 рBS/121bpCOL7H.18 с BamHI (сайт BamHI лежит в 5'-конце фрагмента коллагенового промотора $I\alpha 2$), дефосфорилируют посредством обработки фрагментом Кленова и лигируют с линкером Sall (5'-GGTCGACC-3'), посредством чего размещают сайт Sall ниже

коллагенового промотора $I_{\alpha 2}$. Затем эту плазмиду расщепляют Sall и SrfI (сайт SrfI лежит на 110 п.о. ниже CAP-сайта коллагенового промотора $I_{\alpha 2}$) и выделяют фрагмент в 3,6 кб. Фрагменты в 0,8 кб и 3,6 кб объединяют с Sall- и BamHI-расщепленной pBSIISK- (Stratagene Inc., Ла-Джолла, Калифорния) и составляют фрагмент из указанных далее четырех олигонуклеотидов, отождествленных вместе (с образованием фрагмента с дефосфорилированным концом и концом BsiHKAI):

5'-GGGCCCCAGCCCCAGCCCTCCCATTGGTG GAGGCCCTTTTGGAGGCCACCTAGGGCCAGG AAACCTTTTGCCGT AT-3'(олиго-COL-1; ПОСЛЕД. N 14);

5'-AAATAGGGCAGATCCGGGCTTTATTATTTAG CACCACGGCCGCGAGACCGCGTCCGCCCC GCGAGCA-3' (олиго-COL-2; ПОСЛЕД. N 15);

5'-TGCCCTATTTATACGGCAAAAGTTTCCTGGCC CTAGGGTGCCTCCAAAAGGGC CTCCACCAATGGGAGGGCTGGGGCTGGGGG CCC-3' (олиго-COL-3; ПОСЛЕД. N 16); и 5'-CGCGGGCGGACGCGGTCTCGGCGGCCGTG GTGCTAAAATAATAAAGCCCGGATC-3' (олиго-COL-4; ПОСЛЕД. N 17). Эти четыре олигонуклеотида, будучи отождествленными, соответствуют области, начинающейся с сайта SrfI коллагенового промотора и проходящей через сайт BsiHKAI β -актинового промотора. Получающуюся в результате плазмиду обозначают pCOL/ β -актин.

Чтобы закончить построение pXAG-28, выделяют Sall-BamHI-фрагмент pCOL/ β -актина, содержащий коллагеновый промотор $I_{\alpha 2}$ и 5' UTS β -актина. Этот фрагмент лигируют с двумя фрагментами из pXAG-16 (см. пример 1А и фиг. 4): (1) BamHI-фрагментом в 6,0 кб (содержащим неоген, плазмидный скелет, кДНК, кодирующую фермент α -гал А в 398 аминокислот, и 3' UTS hGH); и (2) BamHI-XhoI-фрагментом в 0,3 кб (содержащим последовательность поли-А SV40 из pDneo). pXAG-28 содержит промотор человеческого коллагена $I_{\alpha 2}$, слитый с 5' UTS человеческого β -актина, сигнальный пептид hGH (который прерывается первым интроном hGH), кДНК, кодирующую фермент α -гал А, и 3' UTS hGH. Карта завершённой экспрессирующей конструкции pXAG-28 показана на фиг. 5.

В. Трансфекция и селекция фибробластов при электропорации с экспрессирующими α -гал А плазмидами

Чтобы экспрессировать α -гал А в фибробластах, культивируют вторичные фибробласты и трансфектируют методами, описанными в литературе (Selden et al., WO 93/09222).

Плазмиды pXAG-13, pXAG-16 и pXAG-28 трансфектируют посредством электропорации в фибробласты крайней плоти человека, чтобы генерировать устойчиво трансфектированные клональные клеточные штаммы, и получающиеся в результате уровни экспрессии α -гал А контролируют так, как описано в примере IГ. Секреция α -гал А нормальными фибробластами крайней плоти находится в интервале 2-10 единиц на 10^6 клеток за 24 часа. В противоположность этому, трансфектированные фибробласты показывают средние уровни экспрессии,

приведенные в табл. 1.

Эти данные показывают, что все три экспрессирующие конструкции способны превзойти экспрессию α -гал А нетрансфектированными фибробластами во много раз. Экспрессия фибробластами, устойчиво трансфектированными pXAG-13, кодирующей α -гал А, связанную с сигнальным пептидом α -гал А, существенно ниже экспрессии фибробластами, трансфектированными pXAG-16, которая отличается только тем, что сигнальный пептид представляет сигнальный пептид hGH, кодирующая последовательность которого прерывается первым интроном гена hGH.

Каждый раз трансфектированные клетки пересевают, определяют активность секретированной α -гал А, подсчитывают клетки и вычисляют плотность клеток. На основании числа харвестированных клеток и времени, разрешенном для секреции α -гал А, определяют удельную скорость экспрессии α -гал А и указывают ее в таблицах 2 и 3 в виде секретируемых единиц (α -гал А) на 10^6 клеток за период 24 часа. Клеточные штаммы, нужные для генной терапии или для применения при получении материала для выделения чистой α -гал А, должны показывать стабильный рост и экспрессию при нескольких посевах. Данные, полученные для клеточных штаммов, приведенных в таблицах 2 и 3, которые устойчиво трансфектированы экспрессирующей α -гал А конструкцией pXAG-16, поясняют факт, что экспрессия α -гал А устойчиво сохраняется при проведении серийных посевов.

Г. Количественная оценка экспрессии α -гал А

Активность α -гал А измеряют с использованием водорастворимого субстрата 4-метилумбеллиферил- α

-D-галактопиранозида (4-MUF-gal; Research Products, Inc.) по видоизмененной схеме, описанной Ioannou et al., J. Cell Biol., 119: 1137-1150, 1992. Субстрат растворяют в буфере для субстрата (0,1 М цитратфосфата, pH 4,6) до концентрации 1,69 мг/мл (5 мМ). Обычно к 75 мкл раствора субстрата добавляют 10 мкл культурального супернатанта. Пробирки закрывают и инкубируют на водяной бане при 37 °C в течение 60 минут. По окончании инкубационного периода для остановки реакции используют 2 мл глицинкарбонатного буфера (130 мМ глицина, 83 мМ карбоната натрия, pH 10,6). Относительную флуоресценцию каждого образца измеряют с использованием флуорометра модели TK0100 (Hoefel Scientific Instruments) с фиксированной длиной волны возбуждения 365 нм и обнаруживают фиксированную длину волны испускания 460 нм. Показатели образцов сравнивают с показателями стандартов, полученных из 1-мкМ исходного раствора метилумбеллиферона (Sigma Chemical Co.), и вычисляют количество гидролизованного субстрата.

Активность α -гал А выражают в единицах; одна единица активности α -гал А эквивалентна одному наномолью субстрата, гидролизованного за час при 37°C. Данные по экспрессии в клетках обычно выражают в виде

единиц активности α -гал А, выделенной 10^6 клетками за 24 часа. Этот анализ также используют для измерения количества активной α -гал А в клеточных лизатах и в образцах с различных стадий очистки α -гал А, описанных ниже.

Пример II. Очистка α -гал А от кондиционированной среды штаммов устойчиво трансфектированных человеческих клеток

В примерах IIA-IIIД показывается, что α -гал А из кондиционированной среды культивированных штаммов человеческих клеток, устойчиво трансфектированных для продуцирования фермента, можно очистить почти до однородного состояния.

А. Применение хроматографии на бутилсефарозе[®] как первой стадии очистки α -гал А

Холодную кондиционированную среду (1,34 л) делают прозрачной посредством центрифугирования и фильтруют через 0,45-мкм ацетатцеллюлозный фильтр с использованием префильтров из стекловолокна. После перемешивания доводят pH холодной отфильтрованной среды до 5,6, добавляя по каплям 1N HCl, и добавляют сульфат аммония до конечной концентрации 0,66 М путем добавления по каплям исходного 3,9 М раствора (комнатной температуры) сверхчистого сульфата аммония. Среду перемешивают еще в течение 5 минут при 4°C, фильтруют так же, как раньше, и вносят в колонку Fast Flow с бутилсефарозой[®] (объем колонки 81 мл, 2,5 x 16,5 см; Pharmacia, Упсала, Швеция), которую уравнивают 10 mM MES-трис, pH 5,6, содержащим 0,66 М сульфата аммония (буфер А). Хроматографию осуществляют при 4°C на системе Gradi-FracTM (Pharmacia, Упсала, Швеция), снабженной подключенными регистраторами УФ и проводимости для оценки общего содержания белка и концентрации солей соответственно. После внесения образца при скорости потока 10 мл/мин колонку промывают буфером А в объеме, составляющем 10 объемов колонки. Из колонки с бутилсефарозой[®] α -гал А элюируют с градиентом от буфера А (содержащего сульфат аммония) до 10 mM MES-трис, pH 5,6 (без сульфата аммония) при общем объеме, равном 14 объемам колонки. Фракции анализируют на активность α -гал А посредством анализа с 4-MUF-gal и объединяют фракции, содержащие существенное количество активного фермента. Как видно на фиг. 6 и по итогам очистки (табл. 4), на этой стадии удаляется приблизительно 99% загрязняющего белка (общее количество белка в образце до загрузки в колонку 8,14 г; после выхода из колонки общее количество белка 0,0638 г).

Б. Применение хроматографии на гепаринсефарозе[®] как стадия очистки α -гал А

Максимальные фракции из колонки с бутилсефарозой[®] диализуют при 4°C против (4 л) 10 mM MES-трис, pH 5,6 (с одной заменой). Проводимость диализата доводят до 1,0 ммо (мСм) при 4°C путем добавления H₂O или NaCl, что требуется. После этого образец вносят в колонку Fast Flow с гепаринсефарозой[®] (Pharmacia,

Упсала, Швеция; объем колонки 29 мл, 2,5 x 6 см), которая уравновешена 10 mM MES-трис, pH 5,6, содержащим 9 mM NaCl (буфер Б). Это делают при 4°C и скорости потока 10 мл/мин. Общее содержание белка и концентрацию солей измеряют подключенными регистраторами УФ (280 нм) и проводимости. После внесения образца колонку промывают буфером Б в объеме, равном 10 объемам колонки (10 "колоночными" объемами). А затем 3 "колоночными" объемами с градиентом до 8% буфера В в 92% буфера Б (где буфер В представляет 10 mM MES-трис, pH 5,6, содержащий 250 mM NaCl) и 10 "колоночными" объемами промывной жидкости с 8% буфера В. За этим следует элюирование α -гал А 1,5 "колоночными" объемами с линейным градиентом до 29% буфера В и последующее - 10 "колоночными" объемами с линейным градиентом до 35% буфера В. Фракции анализируют на активность α -гал А и объединяют фракции, содержащие заметную активность.

В. Применение хроматографии на гидроксипатите как стадия очистки α -гал А

Гепариновый пул фильтруют и вносят в колонку с керамическим гидроксипатитом HC (40 мкм; American International Chemical, Нейтик, Миннесота; объем колонки 12 мл, 1,5 x 6,8 см), уравновешенную 1 mM фосфата натрия, pH 6,0 (буфер Г). Хроматографию осуществляют при комнатной температуре на комбинированной системе

Gradi-FracTM/FPLC[®] (Pharmacia, Упсала, Швеция), снабженной подключенными регистраторами УФ (280 нм) и проводимости. После внесения образца (5 мл/мин) колонку промывают 10 "колоночными" объемами буфера Г. Элюируют α -гал А 7 "колоночными" объемами с линейным градиентом до 42% буфера Д с 58% буфера Г (где буфер Д представляет буфер с 250 mM фосфата натрия, pH 6,0), а затем 10 "колоночными" объемами с градиентом до 52% буфера Д. Фракции анализируют на активность α -гал А и объединяют фракции с заметной активностью.

Г. Применение анионообменной хроматографии на Q-сефарозе[®] как стадия очистки α -гал А

Гидроксипатитный пул разбавляют H₂O приблизительно в 1,5 раза до конечной проводимости 3,4-3,6 ммо при комнатной температуре. После фильтрации образец вносят в колонку с Q-сефарозой[®] HP (Pharmacia, Упсала, Швеция; объем колонки 5,1 мл, 1,5 x 2,9 см), уравновешенную 10% буфера Ж с 90% буфера Е, где буфер Е содержит 25 М фосфата натрия, pH 6,0, а буфер Ж содержит 25 М фосфата натрия, pH 6,0, и 250 mM NaCl. Хроматографию осуществляют при комнатной температуре на комбинированной системе Gradi-FracTM/FPLC[®] (Pharmacia, Упсала, Швеция), и общее количество белка и концентрацию солей контролируют с помощью подключенных регистраторов. Образец вносят при скорости потока 5 мл/мин, затем выполняют следующие стадии: (1) промывка 5 "колоночными" объемами буфера Ж, (2) промывка 7 "колоночными" объемами с 12% буфера Ж, (3) промывка 3 "колоночными" объемами с линейным градиентом до 50%

буфера Ж, (4) промывка 10 "колоночными" объемами с линейным градиентом до 53% буфера Ж, (5) промывка 3 "колоночными" объемами с линейным градиентом до 100% буфера Ж и (6) промывка 10 "колоночными" объемами 100% буфера Ж. Элюируют α -гал А преимущественно при осуществлении стадий 3 и 4. Фракции, содержащие заметную активность, объединяют ("Q-пул").

Д. Применение гель-хроматографии на супердексе[®]-200 как стадия очистки α -гал А

Концентрируют Q-пул приблизительно в 5 раз с использованием центробежных концентраторов Centriprep[®]-10 (Amicon, Бевебли, Миннесота) и вносят в колонку с супердексом[®] 200 (Pharmacia, Упсала, Швеция; объем колонки 189 мл, 1,6 x 94 см). Колонку уравнивают и элюируют буфером с 25 мМ фосфата натрия, pH 6,0, содержащим 150 мМ NaCl. Хроматографию осуществляют на системе FPLC[®] (Pharmacia, Упсала, Швеция) при комнатной температуре с использованием подключенного регистратора УФ (280 нм) для отслеживания элюирования белка. Объем образца, вносимого в колонку, составляет ≤ 2 мл, скорость потока составляет 0,5 мл/мин, и объем фракции составляет 2 мл. Осуществляют много прогонов через колонку; фракции анализируют на активность α -гал А и объединяют фракции с заметной активностью.

Объединенные фракции из колонки с супердексом[®] 200 = концентрируют с использованием установок Centriprep-10, делят на аликваты, быстро замораживают и хранят при -80°C непродолжительное время. Результаты этого примера очистки α -гал А приводятся в табл. 4. Конечный выход α -гал А составляет 59% от активности исходного материала, а удельная активность очищенного продукта составляет $2,92 \times 10^6$ единиц на мг белка. Получающийся в результате продукт показывает высокую степень чистоты после электрофореза в условиях восстановления в 4-15% ДСН-полиакриламидном геле, который по существу не окрашивается серебряным красителем.

Пример III. Составление композиций и хранение очищенной α -гал А

Высокоочищенная α -гал А неустойчива при длительном хранении в виде разбавленных растворов очищенного белка (≤ 1 мг белка на мл). Поэтому разрабатывают композицию, улучшающую устойчивость при длительном хранении, т.е. хранении, длящемся от нескольких недель до, по меньшей мере, нескольких месяцев. Очищенный фермент концентрируют по меньшей мере до уровня 1 мг/мл с использованием центробежного концентратора (в буфере для фермента, состоящем из 25 мМ фосфата натрия (pH 6,0) и 150 мМ NaCl). Добавляют сывороточный альбумин человека (HSA; Buminat[®], Baxter-Hyland) до конечной концентрации 2,5 мг/мл. Затем раствор белка стерилизуют фильтрацией с использованием 0,2-мкм ацетатцеллюлозного фильтра (Schleicher and Schuell), установленного в шприце. Раствор α -гал А помещают в стерильные апиrogenные стеклянные флаконы, плотно закрывают тефлоновыми пробками, быстро замораживают и хранят при -20°C.

Устойчивость активного состояния α -гал

А оценивают на протяжении 3 месяцев с применением анализа с 4-MUF-gal. Данные, приведенные в табл. 5, показывают, что за время испытаний не происходит потери активности фермента. Кислотный pH композиции ($< 6,5$) является критическим показателем для устойчивости фермента высокой степени чистоты.

Пример IV. Продуцированная штаммами человеческих клеток α -гал А, пригодная для лечения дефицита α -гал А

Исследуют структурные и функциональные свойства очищенной человеческой α -гал А, полученной по изобретению, чтобы показать, что описанные здесь молекулы ДНК и соответствующие экспрессированные гликопротеины, продуцированные штаммами трансфектированных человеческих клеток, можно использовать при генной или ферментно-заместительной терапии соответственно.

А. Размер молекулы α -гал А, продуцированной устойчиво трансфектированными человеческими клетками в культуре

Молекулярную массу α -гал А оценивают с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF. Полученные результаты показывают, что молекулярная масса димера составляет 102353 Д, в то время как молекулярная масса мономера составляет 51002Д. Ожидаемая на основании аминокислотного состава молекулярная масса мономера составляет 45400 Д.

Следовательно, можно заключить, что углеводные компоненты фермента увеличивают его молекулярную массу на 5600 Д.

Результаты стандартного анализа аминокислот, выполненного с очищенным белком, согласуются с выводом, что белок, продуцированный человеческими клетками, по аминокислотному составу идентичен белку, выделенному в чистом виде из тканей человека.

Б. N-Терминальный процессинг α -гал А, продуцированной устойчиво трансфектированными человеческими клетками

Нуклеотидная последовательность кДНК человеческой α -гал А кодирует 429 аминокислот. 31 N-концевая аминокислота составляет сигнальную пептидную последовательность, которая отщепляется, когда образующийся белок проходит мембрану эндоплазматического ретикулума (LeDonne et al. Arch. Biochem. Biophys., 224: 186, 1983; Lemansky et al., J. Biol. Chem., 262:2062, 1987). Чтобы подтвердить, что α -гал А процессируется должным образом, когда связана с гетерологичной сигнальной пептидной последовательностью (например, сигнальной последовательностью гормона роста человека), и экспрессируется в трансфектированных фибробластах человека, микросеквенируют 10 N-концевых аминокислот секретлируемого белка. Образцы подвергают электрофорезу методом SDS-PAGE и переносят на ProBlott[®] (ABI, Фостер-Сити, Калифорния) с использованием буферной системы с 10 мМ CAPS (pH 11,0) и 10% метанола. Белок на ProBlott[®] визуализируют посредством окрашивания кумасси и вырезают полосы с соответствующим

размером молекул (50 кД). N-Концевую последовательность получают с использованием импульсного жидкостного анализатора аминокислот Applied Biosystems, который осуществляет автоматическое расщепление по Эдману. Полученная N-концевая последовательность LDNGLARTRT (ПОСЛЕД. N 28) соответствует точному отщеплению сигнального пептида и точно соответствует N-концевой последовательности, предсказанной для секретируемого белка.

В. С-Концевая аминокислота α -гал А, продуцированной устойчиво трансфектированными человеческими клетками

Остаток С-концевой аминокислоты секретируемой α -гал А, полученной по изобретению, идентифицируют с использованием автоматизированного анализатора С- окончаний Hewlett Packard. Результаты показывают в С-конце остаток лейцина, что соответствует С-концевой аминокислоте, предсказанной ДНК-последовательностью.

Г. Вызванная углеводами модификация α -гал А, продуцированной устойчиво трансфектированными человеческими клетками

Оценивают также картину гликозилирования α -гал А, полученной по изобретению. Правильное гликозилирование является важным для оптимальной активности α -гал А in vivo; α -гал А, экспрессированная в негликозилирующих системах, неактивна или неустойчива (Hantzopolous et al. Gene, 57: 159, 1987). Гликозилирование также важно для поглощения α -гал А в нужных клетках-мишенях и влияет на время полужизни фермента в кровотоке in vivo. В каждом звене α -гал А имеется 4 участка, доступных для присоединения аспарагинсвязанных углеводных цепей, из которых занимают только три (Desnick et al. , в "The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease", pp. 2741-2780, McGraw Hill, New York, 1995).

Образец α -гал А, продуцированной устойчиво трансфектированными клетками, для удаления сиаловой кислоты обрабатывают нейраминидазой, которую выделяют из *A. urafaciens* (Boehringer-Mannheim, Индианаполис, Индиана). Эту реакцию осуществляют посредством обработки в течение ночи при комнатной температуре 5 мкг α -гал А нейраминидазы в 10 мкл (общий объем) забуференного ацетатом физиологического раствора (ZAP, 20 мМ ацетата натрия, pH 5,2, 150 мМ NaCl).

Очищенную α -гал А, продуцированную устойчиво трансфектированными клетками, также дефосфорилируют с использованием щелочной фосфатазы (щелочная фосфатаза из кишечника теленка, Boehringer-Mannheim, Индианаполис, Индиана) посредством обработки в течение ночи при комнатной температуре 5 мкг α -гал А 15 Е щелочной фосфатазы в ZAP (pH поднимают до 7,5 с помощью 1 М трис).

Образцы анализируют посредством Вестерн-блоттинга со специфическим антителом против α -гал А. Используемое

антитело представляет кроличье поликлональное антипептидное антитело, полученное с использованием в качестве иммуногена пептида, представляющего аминокислоты 68-81 α -гал А. После переноса белка на мембрану из поливинилиденфторида (PVDF, Millipore, Бедфорд, Миннесота) мембрану зондируют разведенной 1:2000 антисывороткой в 2,5% блотто (обезжиренное сухое молоко в 20 мМ трис-HCl, pH 7,5, 0,05% твина-20). После этого следует детекция с козым антикроличьим IgG, конъюгированным с пероксидазой хрена (Organon Teknika/Cappel, Дарем, Северная Каролина; разведение 1: 5000) и реагентами из набора для хемилюминесценции ECL (Amersham, Арлингтонские Высоты, Индиана).

Обработка α -гал А нейраминидазой приводит к небольшому сдвигу молекулярной массы (приблизительно 1500-2000 Д или 4-6 сиаловых кислот на мономер), что позволяет сделать предположение о существовании удлинённой сиаловой кислотой модификации α -гал А. Для справки, α -гал А плазмы содержит 5-6 остатков сиаловой кислоты на мономер, а плацентарная форма содержит 0,5-1,0 остаток сиаловой кислоты на мономер (Bishop et al., J. Biol. Chem., 256:1307, 1981).

Другим способом, применяемым для исследования модификаций α -гал А с сиаловой кислотой и маннозо-6-фосфатом, является изоэлектрофокусирование (IEF), когда образцы разделяют, основываясь на их изоэлектрической точке (pI) или суммарном заряде. Таким образом, можно ожидать, что удаление из α -гал А заряженных остатков, таких как сиаловая кислота или фосфат, изменит мобильность белка в системе IEF.

Чтобы осуществить эксперименты по IEF, образцы α -гал А, полученной по изобретению, обрабатывают нейраминидазой и щелочной фосфатазой, смешанными в соотношении 1: 1 с 2X буфером Novex для образцов (с 8 М мочевины, pH 3,0-7,0), и загружают в гель для IEF с 6М мочевины (5,5% полиакриламида), полученным с использованием фармалита® (Pharmacia, Упсала, Швеция; pH 3,0-6,5; (фармалит® 4-6,5 и 2,5-5,5, 0,25 мл каждого на гель). Включают также стандарты изоэлектрических точек (Bio-Rad). После электрофореза гель переносят на PVDF и осуществляют Вестерн-блоттинг, как описано выше.

Продуцированная устойчиво трансфектированными фибробластами человека α -гал А состоит из трех основных изоформ с интервалом pI приблизительно 4,4-4,65. Эти величины подобны значениям pI форм α -гал А в плазме и селезенке (Bishop et al., J. Biol. Chem., 256:1307, 1981). Обработка фермента нейраминидазой увеличивает pI всех трех изоформ, что указывает, что все они до некоторой степени модифицированы сиаловой кислотой. Эти данные наводят на мысль, что α -гал А, продуцированная устойчиво трансфектированными фибробластами человека, должна иметь желаемое время полужизни в плазме, что показывает, что этот материал будет подходить для фармакологического применения. Кроме того, обработка щелочной фосфатазой α -гал А,

обработанной нейраминидазой, еще увеличивает ρ части белка приблизительно до 5,0-5,1, что указывает, что фермент содержит один или несколько маннозо-6-фосфатных остатков. Такая модификация важна тем, что она требуется для эффективного поглощения α -гал А клетками-мишенями.

Д. Удельная активность α -гал А, выделенной в чистом виде из устойчиво трансфектированных фибробластов

Потенциальную возможность или удельную активность очищенной α -гал А вычисляют с помощью измерений как каталитической активности фермента (анализ с 4-MUF-gal), так и концентрации белка. Концентрацию белка можно определить любым стандартным способом, таким как способ с системой ВСА (Pierce), или посредством измерения поглощения при 280 нм и использования коэффициента экстинкции, мг/мл, 2,3 (определенного из анализа аминокислот) для вычисления этой величины. При использовании таких методов удельная активность α -гал А, очищенной от кондиционированной среды трансфектированных фибробластов человека, составляет $2,2-2,9 \times 10^6$ единиц на мг белка, что сравнимо с удельной активностью α -гал А, которую очищают от тканей человека (Bishop et al., J. Biol. Chem., 256:1301, 1981).

Е. Поглощение α -гал А, опосредованное маннозой и маннозо-6-фосфатом

Чтобы α -гал А, продуцированная устойчиво трансфектированными фибробластами человека, стала эффективным лечебным средством в случае дефицита α -гал А, фермент должен поглощаться пораженными клетками. При физиологических значениях pH α -гал А неактивна и нет возможности для нее быть эффективной в крови или межклеточных жидкостях. Она оптимально метаболизирует аккумулялированные липидные субстраты только тогда, когда интернализирована в кислой окружающей среде лизосомы. Такое поглощение опосредуется путем связывания α -гал А с маннозо-6-фосфатными рецепторами, экспрессированными на поверхности клетки, и доставки фермента к лизосоме эндоцитическим путем. Рецептор для М6Р экспрессируется повсеместно; до некоторой степени его экспрессируют большинство соматических клеток. Маннозный рецептор, специфический для доступных маннозных остатков на гликопротеинах, является менее распространенным. Последние рецепторы, как правило, обнаруживаются только на макрофагах и подобных макрофагам клетках и предоставляют дополнительные средства для вхождения α -гал А в клетки такого типа.

Чтобы показать опосредованное М6Р поглощение α -гал А, фибробласты кожи пациента с болезнью Фабри (NIGMS, хранилище генетически мутантных клеток) культивируют в течение ночи в присутствии возрастающих концентраций очищенной α -гал А по изобретению. Некоторые из образцов содержат 5 мМ растворимого М6Р, который конкурентно ингибирует связывание и, в результате, поглощение, с помощью

маннозо-6-фосфатного рецептора. Другие образцы содержат 30 мкг/мл маннана, который ингибирует связывание и, в результате, поглощение, с помощью маннозного рецептора. После инкубации клетки промывают и харвестеируют путем соскоба в буфер для лизиса (10 мМ трис, pH 7,2, 100 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТК, 2 мМ пефаблока™ (Boehringer-Mannheim, Индианаполис, Индиана) и 1% NP-40). Лизированные образцы затем анализируют на содержание белка и активность α -гал А. Результаты выражают в единицах активности α -гал А на мг клеточного белка. Клетки Фабри поглощают α -гал А в зависимости от дозы (фиг. 7). Такое поглощение может ингибироваться маннозо-6-фосфатом, но не ингибируется маннаном. Следовательно, поглощение α -гал А в фибробластах Фабри опосредуется маннозо-6-фосфатным рецептором, но не маннозным рецептором.

Также α -гал А поглощается *in vitro* эндотелиальными клетками - важными клетками-мишенями при лечении болезни Фабри. Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVES) культивируют в течение ночи с 7500 единицами α -гал А; некоторые из лунок содержат М6Р. По завершении периода инкубации клетки харвестеируют и анализируют на α -гал А, как описано выше. Клетки, инкубированные только с α -гал А, содержат фермента почти в 10 раз больше, чем контрольные клетки (без инкубации с α -гал А). М6Р ингибирует внутриклеточное накопление α -гал А, что наводит на мысль, что поглощение α -гал А HUVES опосредуется М6Р-рецептором. Таким образом, человеческая α -гал А по изобретению поглощается клинически важными клетками.

Известно, что немногие культивированные линии человеческих клеток экспрессируют маннозный рецептор. Однако линия подобных макрофагам мышиных клеток (J774.E), которая несет маннозные рецепторы, но немного, если (есть) сколько-нибудь маннозо-6-фосфатных рецепторов, может быть использована для определения того, поглощается ли очищенная α -гал А по изобретению с помощью маннозного рецептора (Diment et al., J. Leukocyte Biol., 42:485-490, 1987). Клетки J774.E культивируют в течение ночи в присутствии 10000 единиц α -гал А на мл. Отобранные образцы также содержат 2 мМ М6Р, а другие содержат 100 мкг/мл маннана. Клетки промывают и харвестеируют, как описано выше, и определяют общее содержание белка и активность α -гал А каждого образца. Результаты приводятся в табл. 6. М6Р не ингибирует поглощение α -гал А этими клетками, в то время как маннан снижает уровень накопленной α -гал А на 75%. Таким образом, α -гал А по изобретению может поглощаться при помощи маннозного рецептора в клеточных типах, экспрессирующих этот особый рецептор клеточной поверхности.

Эти эксперименты показывают, что α -гал А, продуцированная устойчиво трансфектированными человеческими клетками, может поглощаться клетками при

помощи маннозного или маннозо-6-фосфатного рецептора.

Ж. Коррекция фибробластов Фабри с помощью фибробластов человека, экспрессирующих α -гал А

В случае генной терапии имплантат аутологических клеток, продуцирующих α -гал А, должен продуцировать фермент в форме, соответствующим образом модифицированной для "исправления" дефицита α -гал А в клетках-мишенях. Чтобы оценить действие продуцирования трансфектированными фибробластами человека α -гал А на клетки Фабри, собранные от пациентов с болезнью Фабри фибробласты (NIGMS, хранилище генетически мутантных человеческих клеток) сокультивируют с продуцирующим α -гал А клеточным штаммом (BRS-11) на Transwells® (Costar, Кемридж, Миннесота). Схема эксперимента приводится на фиг. 8. Клетки Фабри культивируют в 12-луночных планшетах для культивирования тканей, некоторые из которых содержат вставки (Transwells® размер пор 0,4 мкм) с поверхностью, на которой могут расти клетки. Матрица вставки для роста пористая и позволяет макромолекулам проникать с верхней части в нижележащую среду. Одна группа вставок содержит фибробласты крайней плоти здорового человека (HF), которые секретируют α -гал А на минимальном уровне, в то время как другая группа содержит штамм устойчиво трансфектированных фибробластов человека BRS-11, который секретирует большое количество α -гал А. В лунках с сокультивируемыми продуцирующими α -гал А клетками α -гал А может поступать в среду, омывающую клетки Фабри, и, возможно, поглощаться клетками Фабри.

Данные, приведенные в табл. 7, показывают, что клетки Фабри поглощают секретируемую α -гал А. Внутриклеточное содержание α -гал А контролируют в течение трех суток. Клетки, выращенные одни (без вставки) или в присутствии нетрансфектированных фибробластов крайней плоти (вставка HF), имеют очень низкие внутриклеточные уровни активности α -гал А. Клетки Фабри, культивируемые с продуцирующими α -гал А клетками (вставка BRS-11), однако, к концу 2 суток показывают содержание фермента, подобное его количеству в здоровых клетках (нормальные фибробласты содержат 25-80 единиц α -гал А на мг белка). То что эту коррекцию можно приписать α -гал А, поглощенной при посредничестве M6P-рецептора, демонстрируется ее ингибированием маннозо-6-фосфатом (вставка BRS-11 + M6P).

3. Полезность других типов клеток

В описанном здесь способе можно применять другие типы клеток. Клетки можно получить из многих тканей, и к ним могут относиться все типы клеток, которые можно поддерживать в культуре. Например, к первичным и вторичным клеткам, которые можно трансфектировать по способу настоящего изобретения, относятся фибробласты человека, кератиноциты, эпителиальные клетки (например, эпителиальные клетки молочной железы или

кишечника), эндотелиальные клетки, глиальные клетки, невральные клетки, форменные элементы крови (например, лимфоциты и клетки костного мозга), мышечные клетки и предшественники этих типов соматических клеток. Особый интерес представляют фибробласты. Первичные клетки получают, предпочтительно, от индивидуума, которому должны быть введены трансфектированные первичные и вторичные клетки, так что они не будут отторгаться иммунной системой пациента. Однако, если уделить должное внимание предотвращению или подавлению отторжения иммунной системой (как описано ниже), можно также использовать клетки другого донора, а не только пациента. В таком случае будет позволительно использовать клетки из стандартизированной, установленной, устойчиво трансфектированной клеточной линии для всех пациентов.

И. Введение клеток, экспрессирующих α -гал А

Описанные выше клетки можно вводить индивидууму посредством различных стандартных способов введения, так что они будут находиться, например, в ренальной субкапсуле, подкожном пространстве, центральной нервной системе, подболобочном пространстве, печени, брюшной полости или внутри мышцы. Клетки также можно инъецировать внутривенно или интраартериально с тем, чтобы циркулировали в кровотоке индивидуума. Однажды имплантированные индивидууму трансфектированные клетки будут продуцировать и секретировать лечебный продукт гликозилированную человеческую α -гал.

Число генетически модифицированных клеток, которые будут вводиться индивидууму, будет изменяться, но его могут определить специалисты в этой области техники. Возраст, масса, пол и общее физическое состояние каждого пациента, а также объем распределения, время полужизни и биологическая доступность фермента и продуктивность генетически модифицированных клеток *in vivo* будут рассматриваться в первую очередь при определении дозы и способа введения. Как правило, будут применяться от одного миллиона до одного биллиона клеток при уровне экспрессии в интервале 100-100000 единиц на 10^6 клеток в сутки. При необходимости, процедуру можно повторять или изменять до получения нужного результата, например до достижения освобождения от симптомов болезни Фабри.

Как описано выше, используемые клетки обычно будут специфичными для пациента, т. е, полученными от индивидуума, которому должны вводиться трансфектированные первичные или вторичные клетки, так что они будут отторгаться иммунной системой пациента. Однако, если такой сценарий невозможен или нежелателен, клетки, генетически модифицированные так, как описано здесь, можно получить от другого индивидуума и имплантировать пациенту, страдающему от дефицита α -гал А.

Применение клеток от другого индивидуума, не являющегося реципиентом, может потребовать введения иммунодепрессанта, изменения антигенов

гистосовместимости или применения барьерного устройства для предотвращения отторжения имплантированных клеток. Барьерное устройство следует изготавливать из материала (например, мембраны, такой как XM-50 от Amicon, Беверли, Миннесота), который позволяет секреторируемому

продукту проходить в кровоток или ткани пациента, но предотвращает контакт между имплантированными клетками и иммунной системой пациента, и таким образом предотвращает иммунную реакцию (и возможное отторжение) пациента на клетки. Для дополнительного руководства относительно генной терапии см. Selden et al. (WO 93/09222).

С другой стороны, клетки можно внедрить в матрицу или гель, такие как описаны в патентной заявке США, рег. N 08/548/002, совладельцами которой являются заявители, где описывается применение гибридно-матричных имплантатов, или в заявке на патент Jain et al. (заявка PCT WO 95/19430), в которой описывается макроинкапсулирование секреторных клеток в гидрофильный гель (работы, включенные в настоящее в качестве ссылок).

К. Фармацевтическая композиция для обычного введения белка α -гал А

Белок α -гал А, который экспрессируется и секретируется устойчиво трансфектированными (или генетически модифицированными иным способом) человеческими клетками и очищается так, как здесь описано, можно вводить индивидуумам, у которых белок α -гал А продуцируется недостаточно или с нарушениями. Белок можно вводить в фармацевтически приемлемом носителе при pH ниже 6,5, например, в композиции, такая описана в примере III. Примерами эксципиентов, которые можно включать в композицию, являются буферные системы, такие как цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер, аминокислоты, мочевины, спирты, аскорбиновая кислота, фосфолипиды, белки, такие как сывороточный альбумин и желатин, ЭДТК, хлорид натрия, липосомы, поливинилпирролидон, маннит, сорбит, глицерин, пропиленгликоль и полиэтиленгликоль (например, ПЭГ-4000, ПЭГ-6000). Способ введения может представлять, например, внутривенное, интраартериальное, подкожное, интраперитонеальное, интрацеребральное, внутримышечное, внутрилегочное введение или введение через слизистую оболочку. Способ введения и количество отпускаемого белка будет определяться факторами, которые в состоянии определить специалист. Кроме того, специалистам известно, что способ введения и дозировка лечебного белка могут изменяться для данного пациента, пока не получится лечебный уровень дозировки. Как правило, следует вводить дозы α -гал А в 0,01-100 мг на кг массы тела. Ожидается, что в продолжение жизни пациента будут необходимы регулярно повторяемые дозы.

Л. Лечение других состояний, вызванных дефицитом ферментов

Вероятно, что другие состояния, вызванные дефицитом иных, чем α -гал А, ферментов, накапливаемых в лизосомах, могут поддаваться лечению методами, сопоставимыми с описанными здесь. В таких

случаях ДНК, которая кодирует функциональную форму недостающего фермента, следует заменить на ДНК, кодирующую α -гал А в описанных здесь экспрессирующих конструкциях. Примеры синдромов нехватки ферментов, которые идентифицированы и которые могут поддаваться лечению, описанному здесь, даны в табл. 8. Сведения, приведенные в этой таблице, взяты из работы E. Neufeld (Ann. Rev. Biochem., 60:257-280, 1991), включенной в настоящее в качестве ссылки.

V. Другие варианты воплощения изобретения

Описанное здесь изобретение пояснено примерами в части способов лечения, при которых используются клетки, экспрессирующие определенный генный продукт после трансфекции, т.е., после введения конструкции, кодирующей генный продукт и содержащей регуляторные элементы, которые регулируют экспрессию этой кодирующей последовательности. Эти способы также можно осуществить с использованием клеток, которые генетически модифицированы посредством иных процедур, в том числе направленным переносом генов и активацией генов (см. Treco et al., WO 95/31560, включена в настоящее в качестве ссылки; см. также Selden et al., WO 93/09222).

Сигнальный пептид hGH можно использовать с иными, чем α -гал А, гетерологичными белками для повышения уровня экспрессии и секреции гетерологичного белка. Примерами таких белков являются α -1-антитрипсин, антитромбин Ш, аполипопротеин Е, аполипопротеин А-1, факторы свертывания крови V, VII, VIII, IX, X и XIII, фактор роста кости 2, фактор роста кости 7, кальцитонин, каталитические антитела, ДНКаза, эритропоэтин, FSH- β , глобины, глюкагон, глюкоцереброзидаза, G-КСФ, GM-КСФ, гормоны роста, иммуномодуляторы, иммуноглобулины, инсулин, инсулинотропин, инсулиноподобные факторы роста, интерферон- β , интерферон- β -нервные факторы роста, интерлейкин-1, интерлейкин-2, интерлейкин-3, интерлейкин-4, интерлейкин-6, интерлейкин-11, интерлейкин-12, IL-2-рецептор, антагонисты. IL-1-рецептора, рецептор для липопротеина низкой плотности, M-КСФ, паратиреоидный гормон, протеинкиназа С, растворимый CD4, супероксиддисмутаза, тканевый активатор плазминогена, TGF- β , фактор некроза опухоли, TSH- β , тирозингидроксилаза и урокиназа.

Другие варианты воплощения изобретения также входят в объем приведенной далее формулы изобретения.

Список последовательностей приведен в конце текста.

Формула изобретения:

1. Способ лечения пациента, имеющего дефицит α -галактозидазы А (α -гал А), путем введения ему человеческой клетки, генетически модифицированной для сверхэкспрессии и секреции человеческой α -гал А.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что клетку трансфектируют *in vitro* молекулой ДНК с последовательностью, кодирующей

полипептид, содержащий человеческую α -гал А (ПОСЛЕД. 26).

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что полипептид дополнительно содержит гетерологичный сигнальный пептид.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что гетерологичный сигнальный пептид представляет сигнальный пептид человеческого гормона роста (hGH) (ПОСЛЕД. 21).

5. Способ по п. 3, отличающийся тем, что молекула ДНК содержит интрон в последовательности, кодирующей сигнальный пептид.

6. Молекула ДНК, содержащая первую последовательность, кодирующую сигнальный пептид hGH (ПОСЛЕД. 21), причем указанная первая последовательность содержит интрон; и присоединенную к 3'-концу первой последовательности вторую последовательность, кодирующую полипептид, содержащий человеческую α -гал А.

7. Экспрессирующая конструкция, содержащая молекулу ДНК по п. 6 и пригодная для экспрессии в человеческой клетке.

8. Белок, содержащий сигнальный пептид hGH (ПОСЛЕД. 21), соединенный пептидной связью с человеческой α -гал А.

9. Способ получения гликозилированной человеческой α -гал А, включающий культивирование человеческой клетки, содержащей молекулу ДНК, которая кодирует полипептид, содержащий человеческую α -гал А связанную с гетерологичным сигнальным пептидом и допускает экспрессию полипептида в клетке, причем клетка культивирована в условиях, допускающих экспрессию человеческой α -гал А указанной молекулой ДНК и выделение гликозилированной человеческой α -гал А в культуральную среду клетки.

10. Способ очистки образца человеческой α -гал А, включающий первую стадию хроматографии, когда образец пропускают через гидрофобную, вступающую во взаимодействие смолу, причем смола необязательно содержит бутильную группу в качестве функциональной группы.

11. Способ лечения, включающий введение очищенной гликозилированной человеческой α -гал А пациенту с на дефицит α -гал А.

12. Терапевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемую очищенную человеческую α -гал А с N-присоединенным маннозо-6-фосфатом в фармацевтически приемлемом носителе.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(1) ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

- (I) ЗАЯВИТЕЛЬ: Transkaryotic Therapies, Inc
- (II) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ: ЛЕЧЕНИЕ СЛУЧАЕВ ДЕФИЦИТА α -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ А
- (III) ЧИСЛО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: 28
- (IV) АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:
- (A) АДРЕСАТ: Fish & Richardson, P.C.
 - (B) УЛИЦА: 225 Franklin Street
 - (B) ГОРОД: Бостон
 - (Г) ШТАТ: Миннесота
 - (Д) СТРАНА: США
 - (E) ZIP: 02110-2804
- (V) ФОРМА КОМПЬЮТЕРНОГО СЧИТЫВАНИЯ:
- (A) ТИП СРЕДЫ: дискета
 - (Б) КОМПЬЮТЕР: совместимый с системой IBM PC
 - (B) ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА: PC-DOS/MS-DOS
 - (Г) ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ: PatentIn Release # 1.0, версия # 1.30
- (VI) СВЕДЕНИЯ О ТЕКУЩЕЙ ЗАЯВКЕ:
- (A) НОМЕР ЗАЯВКИ:
 - (Б) ДАТА РЕГИСТРАЦИИ:
 - (B) КЛАССИФИКАЦИЯ:
- (VII) СВЕДЕНИЯ О ПРЕДШЕСТВУЮЩЕЙ ЗАЯВКЕ:
- (A) НОМЕР ЗАЯВКИ: 08/712614
 - (Б) ДАТА РЕГИСТРАЦИИ: 13 СЕНТ 1996
 - (B) КЛАССИФИКАЦИЯ:
- (VIII) СВЕДЕНИЯ ОБ АГЕНТЕ/ПОВЕРЕННОМ:
- (A) ИМЯ: Fraser, Janis K.
 - (Б) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР: 34819
 - (B) НОМЕР ДЕЛА/РЕЕСТРА: 07236/003W01
- (IX) ТЕЛЕКОММУНИКАЦИОННАЯ ИНФОРМАЦИЯ:
- (A) ТЕЛЕФОН: 617/542-5070
 - (Б) ТЕЛЕФАКС: 617/542-8906
 - (B) ТЕЛЕКС: 200154

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 1

- (I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
- (A) ДЛИНА: 22 пары оснований
 - (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
 - (B) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 1
СТGGGCTGTA GCTATGATAA AC 22

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 2

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 21 пара оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 2
TCTAGCTGAA GCAAAAACAGT G 21

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 3

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 19 пар оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 3
ATTGGTCCGC CCCTGAGGT 19

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 4

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 20 пар оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 4
TGATGCAGGA ATCTGGCTCT 20

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 5

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 20 пар оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 5
TTTTGGATCC ACCATGGSTA 20

RU 2179034 C2

RU 2179034 C2

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 6

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 24 пары оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 6

TTTTGCCGGC АСТGCCСТСТ TGAА

24

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 7

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 24 пары оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 7

TTTTСAGСТG GАСААТGGАТ TGGC

24

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 8

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 20 пар оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 8

TTTTGСТAGC TGGCGAATCC

20

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 9

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 30 пар оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 9

TTTTGGATCC GTGTCCСАТА GTGTTTCCAA

30

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 10

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 28 пар оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота

(В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 10

TTTTGGATCC GCAGTCGTGG CСAGTACC

28

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 11

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(А) ДЛИНА: 12 пар оснований

(Б) ТИП: нуклеиновая кислота

(В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 11

СТАGTCСТАG GA

12

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 12

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(А) ДЛИНА: 22 пары оснований

(Б) ТИП: нуклеиновая кислота

(В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 12

TTTTGAGCAC AGAGCCTCGC CT

22

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 13

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(А) ДЛИНА: 30 пар оснований

(Б) ТИП: нуклеиновая кислота

(В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 13

TTTTGGATCC GGTGAGCTGC GAGAATAGCC

30

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 14

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(А) ДЛИНА: 76 пар оснований

(Б) ТИП: нуклеиновая кислота

(В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 14

GGGCCCCCAG CCCCAGCCCT CCCATTGGTG GAGGCCCTTT TGGAGGCACC СТАGGGCCAG

60

RU 2179034 C2

RU 2179034 C2

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 15

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 69 пар оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 15

AAATAGGGCA GATCCGGGCT TTATTATTTT AGCACCACGG CCGCCGAGAC CGCGTCCGCC 60
 CCGCGAGCA 69

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 16

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 86 пар оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 16

TGCCСТАТТТ АТАСГГСААА АГТТТССТГГ СССТАГГГТГ ССТССААААГ ГГССТССАСС 60
 ААТГГГАГГГ СТГГГГСТГГ ГГГССС 86

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 17

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 55 пар оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 17

CGCGGGGCGG ACGCGGTCTC GCGGCCGTG GTGSTAAAAT AATAAAGCCC GGATC 55

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 18

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 1343 пары оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 18

RU 2179034 C2

RU 2179034 C2

CCGCGGGAAA TTTATGCTGT CCGGTCACCG TGACAATGCA GCTGAGGAAC CCAGAACTAC	60
ATCTGGGCTG CGCGCTTGGC CTTCGCTTCC TGGCCCTCGT TTCCTGGGAC ATCCCTGGGG	120
CTAGAGCACT GGACAATGGA TTGGCAAGGA CGCCTACCAT GGGCTGGCTG CACTGGGAGC	180
GCTTCATGTG CAACCTTGAC TGCCAGGAAG AGCCAGATTC CTGCATCAGT GAGAAGCTCT	240
TCATGGAGAT GGCAGAGCTC ATGGTCTCAG AAGGCTGGAA GGATGCAGGT TATGAGTACC	300
TCTGCATTGA TGACTGTTGG ATGGCTCCCC AAAGAGATTC AGAAGGCAGA CTTCAGGCAG	360
ACCCTCAGCG CTTTCCTCAT GGGATTCGCC AGCTAGCTAA TTATGTTTCC AGCAAAGGAC	420
TGAAGCTAGG GATTTATGCA GATGTTGGAA ATAAAACCTG CGCAGGCTTC CCTGGGAGTT	480
TTGGATACTA CGACATTGAT GCCCAGACCT TTGCTGACTG GGGAGTAGAT CTGCTAAAA	540
TTGATGGTTG TTAAGTGTGAC AGTTTGGAAA ATTGGCAGA TGGTTATAAG CACATGTCTT	600
TGGCCCTGAA TAGGACTGGC AGAAGCATTG TGTACTCCTG TGAGTGGCCT CTTTATATGT	660
GGCCCTTTCA AAAGCCCAAT TATACAGAAA TCCGACAGTA CTGCAATCAC TGGCGAAATT	720
TTGCTGACAT TGATGATTCC TGGAAAAGTA TAAAGAGTAT CTTGGACTGG ACATCTTTTA	780
ACCAGGAGAG AATTGTTGAT GTTGCTGGAC CAGGGGGTTG GAATGACCCA GATATGTTAG	840
TGATTGGCAA CTTTGGCCTC AGCTGGAATC AGCAAGTAAC TCAGATGGCC CTCTGGGCTA	900
TCATGGCTGC TCCTTTATTC ATGTCTAATG ACCTCCGACA CATCAGCCCT CAAGCCAAAG	960
CTCTCCTTCA GGATAAGGAC GTAATTGCCA TCAATCAGGA CCCCTTGGGC AAGCAAGGTT	1020
ACCAGCTTAG ACAGGGAGAC AACTTTGAAG TGTGGGAACG ACCTCTCTCA GGCTTAGCCT	1080
GGGCTGTAGC TATGATAAAC CGGCAGGAGA TTGGTGGACC TCGCTCTTAT ACCATCGCAG	1140
TTGCTTCCCT GGGTAAAGCA GTGGCCTGTA ATCCTGCCTG CTTTCATCACA CAGCTCCTCC	1200
CTGTGAAAAG GAAGCTAGGG TTCTATGAAT GGAAGTCAAG GTTAAGAAGT CACATAAATC	1260
CCACAGGCAC TGTTTTGCTT CAGSTAGAAA ATACAATGCA GATGTCATTA AAAGACTTAC	1320
TTTAAAAAAA AAAAAAACTC GAG	1343

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 19

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 210 пар оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 19

CTGGGCTGTA GCTATGATAA ACCGGCAGGA GATTGGTGGG CCTCGCTCTT ATACCATCGC	60
AGTTGCTTCC CTGGGTAAAG GAGTGGCCTG TAATCCTGCC TGCTTCATCA CACAGCTCCT	120
CCCTGTGAAA AGGAAGCTAG GGTTCATGTA ATGGACTTCA AGGTTAAGAA GTCACATAAA	180
TCCACAGGC ACTGTTTTGC TTCAGSTAGA	210

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 20

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

RU 2179034 C2

RU 2179034 C2

- (А) ДЛИНА: 268 пары оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 20

ATTGGTCCGC CCCTGAGGTT AATCTTAAAA GCCCAGGTTA CCCGCGGAAA TTTATGCTGT	60
CCGGTCACCG TGACAATGCA GCTGAGGAAC CCAGAАСТАС АТСТGGGCTG CGCGCTTGCG	120
CTTCGCTTCC TGGCCSTCGT TTCCTGGGAC ATCCCTGGGG CTAGAGCACT GGACAATGGA	180
TTGGCAAGGA CGCCTACCAT GGGCTGGCTG CACTGGGAGC GCTTCATGTG CAACCTTGAC	240
TGCCAGGAAG AGCCAGATTC CTGCATCA	268

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 21

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 26 аминокислот
- (Б) ТИП: аминокислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: не имеет отношения
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(II) ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 21

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu	
1 5 10 15	
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Clu Gly Ser Ala	
20 25	

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 22

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 78 пар оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 22

ATGGCTACAG GCTCCCGGAC GTCCCTGCTC CTGGCTTTTG GCCTGCTCTG CCTGCCCTGG	60
CTTCAAGAGG GСAGTGCC	78

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 23

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 35 пар оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная

RU 2179034 C2

RU 2179034 C2

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 23

TTTTGGATCC STCGAGGACA TTGATTATTG АСТАG

35

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 24

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 28 пар оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 24

TTTTGGATCC CGTGTCAAGG ACGGTGAC

28

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 25

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 1197 пары оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 25

CTGGACAATG GATTGGCAAG GACGCCTACC ATGGGCTGGC TGCAC TGGA GCGCTTCATG	60
TGCAACCTTG ACTGCCAGGA AGAGCCAGAT TCCTGCATCA GTGAGAAGCT CTTTCATGGAG	120
ATGGCAGAGC TCATCGTCTC AGAAGGCTGG AAGGATGCAG GTTATGAGTA CCTCTGCATT	180
GATGACTGTT GGATGGCTCC CCAAGAGAT TCAGAAGGCA GACTTCAGGC AGACCCTCAG	240
CGCTTTCCTC ATGGGATTCG CCAGCTAGCT AATTATGTTT ACAGCAAAGG ACTGAAGCTA	300
GGGATTTATG CAGATGTTGG AAATAAAACC TGCGCAGGCT TCCCTGGGAG TTTTGGATAC	360
TACGACATTG ATGCCCAGAC CTTTGCTGAC TGGGGAGTAG ATCTGCTAAA ATTTGATGGT	420
TGTTACTGTG ACAGTTTGGG AAATTTGGCA GATGGTTATA AGCACATGTC CTGGGCCCTG	480
AATAGGACTG GCAGAAGCAT TGTGTA CTCC TGTGAGTGGC CTCTTTATAT GTGGCCCTTT	540
CAAAAGCCCA ATTATACAGA AATCCGACAG TACTGCAATC ACTGGCGAAA TTTTGCTGAC	600
ATTGATGATT CCTGGAAAAG TATAAAGAGT ATCTTGGACT GGACATCTTT TAACCAGGAG	660
AGAATTCTTG ATGTTGCTGG ACCAGGGGGT TGGAAATGACC CAGATATGTT AGTGATTGGC	720
AACTTTGGCC TCAGCTCGAA TCAGCAAGTA ACTCAGATGG CCCTCTGGGC TATCATGCCT	780
GCTCCTTTAT TCATGTCTAA TGACCTCCGA CACATCAGCC CTCAAGCCAA AGCTCTCCTT	840
CAGGATAAGG ACGTAATTGC CATCAATCAG GACCCCTTGG GCAAGCAAGG GTACCAGCTT	900
AGACAGGGAG ACAACTTTGA AGTGTGGGAA CGACCTCTCT CAGGCTTAGC CTGGGCTGTA	960
GCTATGATAA ACCGGCAGGA GATTGGTGGG CCTCGCTCTT ATACCATCGC AGTTGCTTCC	1020
CTGGGTAAAG GAGTGGCCTG TAATCCTGCC TGCTTCATCA CACAGCTCCT CCCTGTGAAA	1080
AGGAAGCTAG GGTTCATGTA ATGGA CTCA AGGTAAAGAA GTCACATAAA TCCCACAGGC	1140
ACTGTTTTGC TTCAGCTAGA AAATACAATG CAGATGT CAT TAAAAGACTT ACTTTAA	1197

RU 2179034 C2

RU 2179034 C2

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 26

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 398 аминокислот
- (Б) ТИП: аминокислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: не имеет отношения
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(II) ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 26

Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp
1 5 10 15
Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys
20 25 30
Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu
35 40 45
Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp
50 55 60
Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln
65 70 75 80
Arg Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys
85 90 95
Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala
100 105 110
Gly Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe
115 120 125
Ala Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp
130 135 140
Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu
145 150 155 160
Asn Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr
165 170 175
Met Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys
180 185 190
Asn His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile
195 200 205
Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp
210 215 220
Val Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly
225 230 235 240
Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp
245 250 255
Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile
260 265 270
Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile
275 280 285
Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp
290 295 300
Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val
305 310 315 320

Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile
325 330 335

Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe
340 345 350

Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp
355 360 365

Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu
370 375 380

Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
385 390 395

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 27

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 338 пар оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: одноцепочечная
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. № 27

ATGGCTACAG GTAAGCGCCC СТААААТССС ТТТGGGCACA ATGTGTCCTG AGGGGAGAGG	60
CAGCGACCTG TAGATGGGAC GGGGGCACA ACCCTCAGGT TTGGGGCTTC TGAATGTGAG	120
TATCGCCATG TAAGCCSAGT ATTTGGCCAA TCTCAGAAAG CTCCTGGTCC CTGGAGGGAT	180
GGAGAGAGAA АААСАААСАG CTCCTGGAGC AGGGAGAGTG CTGGCCTCTT GCTCTCCGGC	240
TCCCTCTGTT GCCCTCTGGT TTCTCCCCAG GCTCCCCGAC CTCCTGCTC CTGGCTTTTG	300
GCCTGCTCTG CCTGCCCTGG CTCAAGAGG GCAGTGCC	338

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕД. № 28

(I) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (А) ДЛИНА: 10 аминокислот
- (Б) ТИП: аминокислота
- (В) ЦЕПОЧЕЧНОСТЬ: не имеет отношения
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(II) ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

(XI) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: ПОСЛЕД. NO:28:

Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr
1 5 10

RU 2179034 C2

RU 2179034 C2

Таблица 1

Средние уровни экспрессии α -гал А
(+/- стандартное отклонение)

pXAG-13:	420 +/- 344 E/10 ⁶ клеток/сутки N=26 клональных штаммов (интервал 3 - 1133 E/10 ⁶ клеток в сутки)
pXAG-16:	2051 +/- 1253 E/10 ⁶ клеток/сутки N=24 клональных штамма (интервал 422 - 5200 E/10 ⁶ клеток в сутки)
pXAG-28:	141 +/- 131 E/10 ⁶ клеток/сутки N=38 клональных штаммов (интервал 20 - 616 E/10 ⁶ клеток в сутки)

Таблица 2

Рост и экспрессия клеток BRS-11, содержащих
экспрессирующую α -гал А конструкцию pXAG-16

BRS-11		
Пересев	Экспрессия (единиц/10 ⁶ клеток/24 часа)	Плотность клеток (клетки/см ²)
13	2601	4,80x10 ⁴
14	1616	4,40x10 ⁴
15	3595	4,40x10 ⁴

Таблица 3

Рост и экспрессия клеток HF503-242, содержащих
экспрессирующую α -гал А конструкцию pXAG-16

HF503-242		
Пересев	Экспрессия (единиц/10 ⁶ клеток/24 часа)	Плотность клеток (клетки/см ²)
5	4069	2,80x10 ⁴
6	7585	3,55x10 ⁴
7	5034	2,48x10 ⁴

Таблица 4

Очистка α -гал А от кондиционированной среды
устойчиво трансфектированных человеческих
фибробластов

Стадия очистки	Объем (мл)	Активность α -гал А ($\times 10^6$ единиц)	Общий белок (мг)	Удельная активность ($\times 10^6$ ед/мг)	Кратность очистки (кумулят.)	Процент извлечения
Культуральный супернатант	1340	14,6	8140	0,0018	=1	=100
Бутил- сефароза®	417	14,1	63,8	0,221	123	96,6
Гепарин- сефароза®	134	12,1	14,6	0,829	436	82,9
Гидроксиапатит	47	9,73	4,46	2,18	1220	66,6
Q-сефароза®	31,5	8,91	3,31	2,69	1503	61,0
Супердекс® 200	10	8,58	2,93	2,92	1634	59,0

Таблица 5

Устойчивость композиций α -гал А при -20°C

Образец	Удельная активность (единиц на мг общего белка)
Время 0	$2,24 \times 10^6 \pm 0,33 \times 10^6$
1 неделя	$2,40 \times 10^6 \pm 0,25 \times 10^6$
2 недели	$2,42 \times 10^6 \pm 0,21 \times 10^6$
3 недели	$2,37 \times 10^6 \pm 0,05 \times 10^6$
1 месяц	$2,39 \times 10^6 \pm 0,16 \times 10^6$
2 месяца	$2,31 \times 10^6 \pm 0,26 \times 10^6$
3 месяца	$2,29 \times 10^6 \pm 0,17 \times 10^6$

Поглощение α -гал А клетками J774.Е

Активность α-гал А (единиц/мг общего белка)				
	Без добавок	+ α -гал А	+ α -гал А + М6Р	+ α -гал А, + маннан
J774.Е	409 \pm 25	6444 \pm 554	6297 \pm 674	1654 \pm 323

[маннан] =100мкг/мл

[М6Р] = 2 мМ или 660 мкг/мл

Коррекция фибробластов Фабри фибробластами

человека, экспрессирующими α -гал А

Активность α-гал А (единиц/мг общего белка)				
Время	Без вставки	Вставка HF	Вставка BRS-11	Вставка BRS-11+М6Р
День 1	2 \pm 1	2 \pm 1	13 \pm 1	4 \pm 1
День 2	2 \pm 1	2 \pm 1	40 \pm 11	6 \pm 2
День 3	2 \pm 1	5 \pm 1	85 \pm 1	9 \pm 1

RU 2179034 C2

RU 2179034 C2

Перечень нарушений лизосомного накопления

Нарушение	Первичный [вторичный] дефицит фермента
-----------	---

Нарушение расщепления сфинголипидов

Болезнь Фабри	α -галактозидаза
Болезнь Фабри	церамидаза
Болезнь Гоше	глюкоцереброзидаза
G _{M1} ганглиозидоз	β -галактозидаза
Подгруппа G _{M2} ганглиозидоза	β -гексозаминидаза, α -субединица
Болезнь Тея-Сакса	[гексозаминидаза А]
Подгруппа болезни Сандхоффа	β -гексозаминидаза, β -субединица [гексозаминидазы А и В]
Дефицит активатора	G _{M2} активатор
Болезнь Краббе	галактозилцерамидаза
Метахроматическая лейкодистрофия	
форма с дефицитом фермента	арилсульфатаза А
форма с дефицитом активатора	сульфатид активатор/сапозин
Муколипидоз типа IV	первичный дефект неизвестен [ганглиозидсиалидаза]
Множественный дефицит сульфатаз	первичный дефект неизвестен [дефицит всех сульфатаз]
Болезнь Ниманна-Пика	сфингомиелиназа
Болезнь Шиндлера	α -N-ацетилгалактозаминидаза

Нарушение расщепления гликопротеинов

Аспартилгликозаминурия	аспартилгликозаминидаза
Фукозидоз	α -L-фукозидаза
Галактозиалидоз	антитело/катепсин [β -галактозидаза и сиалидаза]
α -Маннозидоз	α -маннозидаза

β -Маннозидоз β -маннозидаза

Сиалидоз сиалидаза

Нарушение расщепления гликозаминогликанов

Синдром Гунтера идуронатсульфатаза

Синдромы Гурлер и Шейе α -L-идуронидаза

Синдром Марото-Лами GalNAc-4-сульфатаза/арил-сульфатаза

Синдром Моркио

подтип А Gal-6-сульфатаза

подтип В β -галактозидаза

Синдром Санфилиппо

подтип А гепарин-N-сульфатаза

подтип В α -N-ацетилглюкозаминидаза

подтип С ацетилCoA: глюкозамин-6-N-ацетилтрансфераза

подтип D GlcNAc-6-сульфатаза

Синдром Sly β -глюкуронидаза

Нарушения из-за дефицита других отдельных ферментов

Болезнь Помпе (гликогеноз α -глюкозидаза
типа II)

Болезнь Вольмана кислая липаза

Нарушения биосинтеза лизосомных ферментов

Болезнь I-cell и псевдо- 6-фосфо-N-ацетилглюкозамин-
Гурлер полидистрофия трансфераза
[неправильная локализация
многих лизосомных ферментов]

Нарушения переноса через лизосомные мембраны

Цистиноз перенос цистина

Накопление сиаловых кислот ; перенос сиаловых кислот
и болезнь Salla

CTGGGCTGTAGCTATGATAAACCGGCAGGA
GATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCA
GTTGCTTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTA
ATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCCT
GTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATGAATGGA
CTTCAAGGTTAAGAAGTCACATAAATCCCAC
AGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGA

Фиг. 1

ATTGGTCCGCCCTGAGGTTAATCTTAAAAG

SacII

CCCAGGTTACCCGCGGAAATTTATGCTGTC
CGGTCACCGTGACAATGCAGCTGAGGAACC
CAGAACTACATCTGGGCTGCGCGCTTGCGCT
TCGCTTCCTGGCCCTCGTTTCCTGGGACATC
CCTGGGGCTAGAGCACTGGACAATGGATTG

NotI

GCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCAC
TGGGAGCGCTTCATGTGCAACCTTGACTGCC
AGGAAGAGCCAGATTCTGCATCA

Фиг. 2

RU 2179034 C2

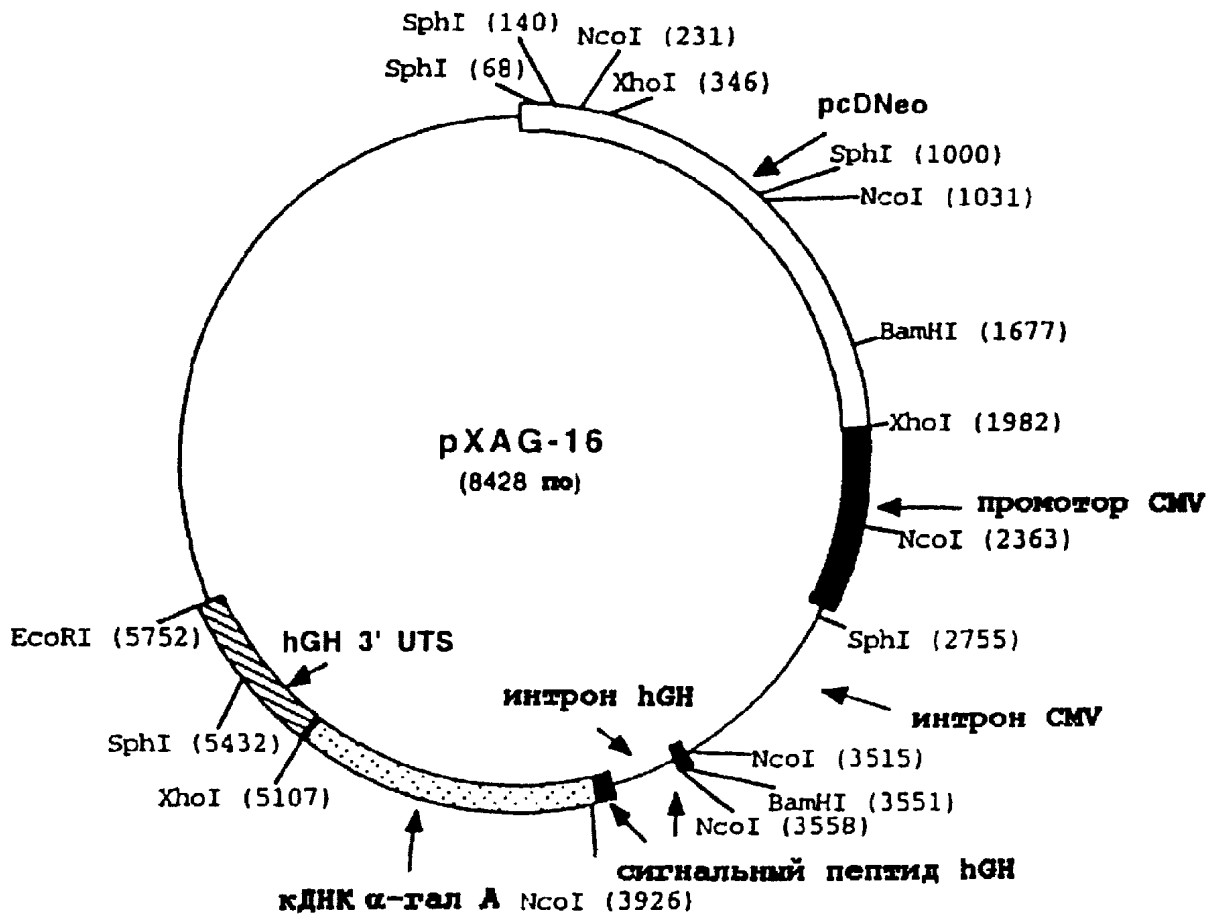
RU 2179034 C2

1 CCGCGGGAAA TTTATGCTGT CCGGTCACCG TGACAATGCA GCTGAGGAAC CCAGAACTAC
 61 ATCTGGGCTG CGCGCTTGGG CTTCGCTTCC TGGCCCTCGT TTCCTGGGAC ATCCCTGGGG
 121 CTAGAGCACT GGACAATGGA TTGGCAAGGA CGCCTACCAT GGGCTGGCTG CACTGGGAGC
 181 GCTTCATGTG CAACCTTGAC TGCCAGGAAG AGCCAGATTG CTGCATCAGT GAGAAGCTCT
 241 TCATGGAGAT GGCAGAGCTC ATGGTCTCAG AAGGCTGGAA GGATGCAGGT TATGAGTACC
 301 TCTGCATTGA TGA CTGTTGG ATGGCTCCCC AAAGAGATTG AGAAGGCAGA CTTCAGGCAG
 361 ACCCTCAGCG CTTTCCTCAT GGGATTGCGC AGCTAGCTAA TTATGTTTAC AGCAAAGGAC
 421 TGAAGCTAGG GATTTATGCA GATGTTGGAA ATAAAACCTG CGCAGGCTTC CCTGGGAGTT
 481 TTGATACTA CGACATTGAT GCCCAGACCT TTGCTGACTG GGGAGTAGAT CTGCTAAAT
 541 TTGATGGTTG TTACTGTGAC AGTTTGGAAA ATTTGGCAGA TGGTTATAAG CACATGTCCT
 601 TGGCCCTGAA TAGGACTGGC AGAAGCATTG TGTACTCCTG TGAGTGGCCT CTTTATATGT
 661 GGCCCTTTCA AAAGCCCAAT TATACAGAA TCCGACAGTA CTGCAATCAC TGGCGAAATT
 721 TTGCTGACAT TGATGATTCC TGGAAAAGTA TAAAGAGTAT CTTGGACTGG ACATCTTTTA
 781 ACCAGGAGAG AATTGTTGAT GTTGCTGGAC CAGGGGGTTG GAATGACCCA GATATGTTAG
 841 TGATTGGCAA CTTTGGCCTC AGCTGGAATC AGCAAGTAAC TCAGATGGCC CTCTGGGCTA
 901 TCATGGCTGC TCCTTTATTC ATGTCTAATG ACCTCCGACA CATCAGCCCT CAAGCCAAAG
 961 CTCTCCTTCA GGATAAGGAC GTAATTGCCA TCAATCAGGA CCCCTTGGGC AAGCAAGGGT
 1021 ACCAGCTTAG ACAGGGAGAC AACTTTGAAG TGTGGGAACG ACCTCTCTCA GGCTTAGCCT
 1081 GGGCTGTAGC TATGATAAAC CGGCAGGAGA TTGGTGGACC TCGCTCTTAT ACCATCGCAG
 1141 TTGCTTCCCT GGSTAAAGGA GTGGCCTGTA ATCCTGCCTG CTTCATCACA CAGCTCCTCC
 1201 CTGTGAAAAG GAAGCTAGGG TTCTATGAAT GGA CTTC AAG GTTAAGAAGT CACATAAATC
 1261 CCACAGGCAC TGTTTGTCTT CAGCTAGAAA ATACAATGCA GATGTCATTA AAAGACTTAC
 1321 TTTAAAAAAA AAAAAAATC GAG

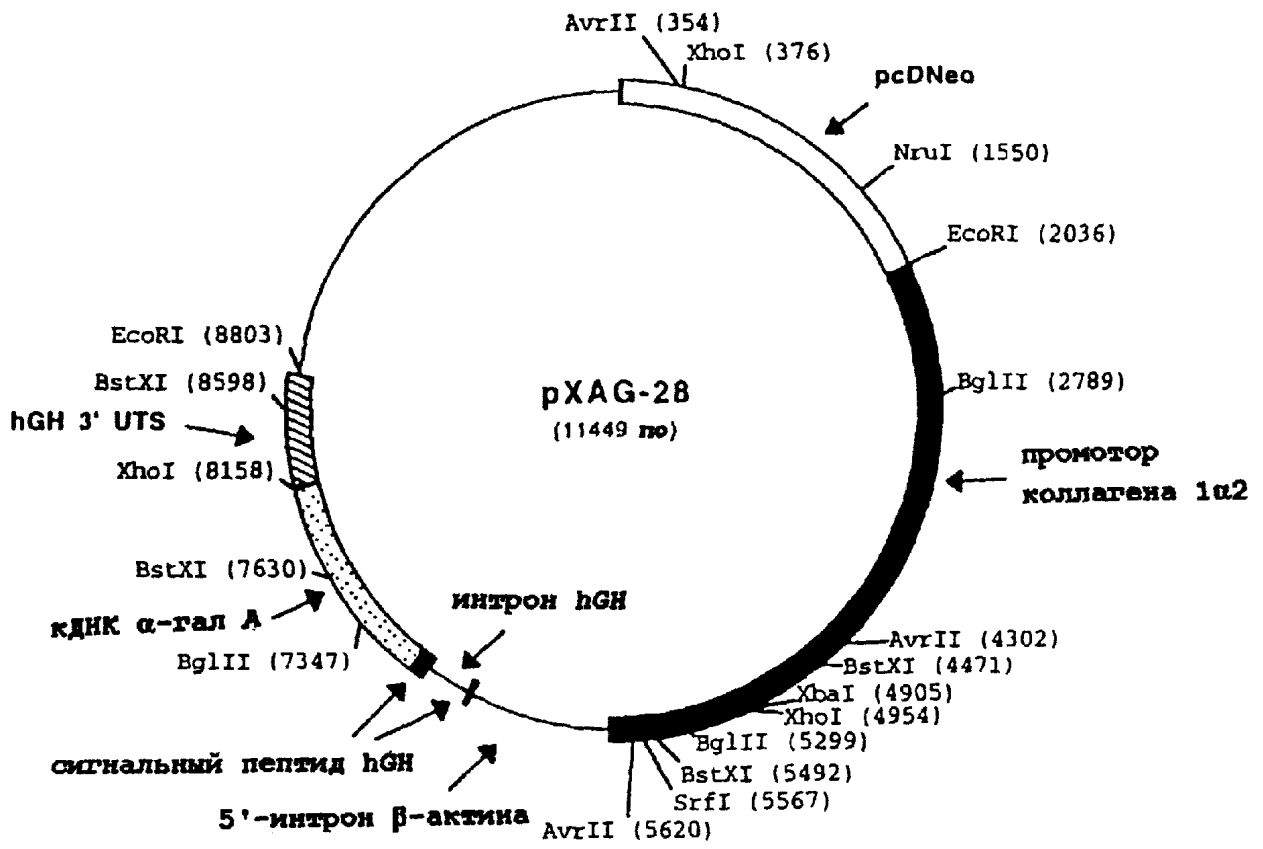
Фиг. 3

RU 2 1 7 9 0 3 4 C 2

RU 2 1 7 9 0 3 4 C 2



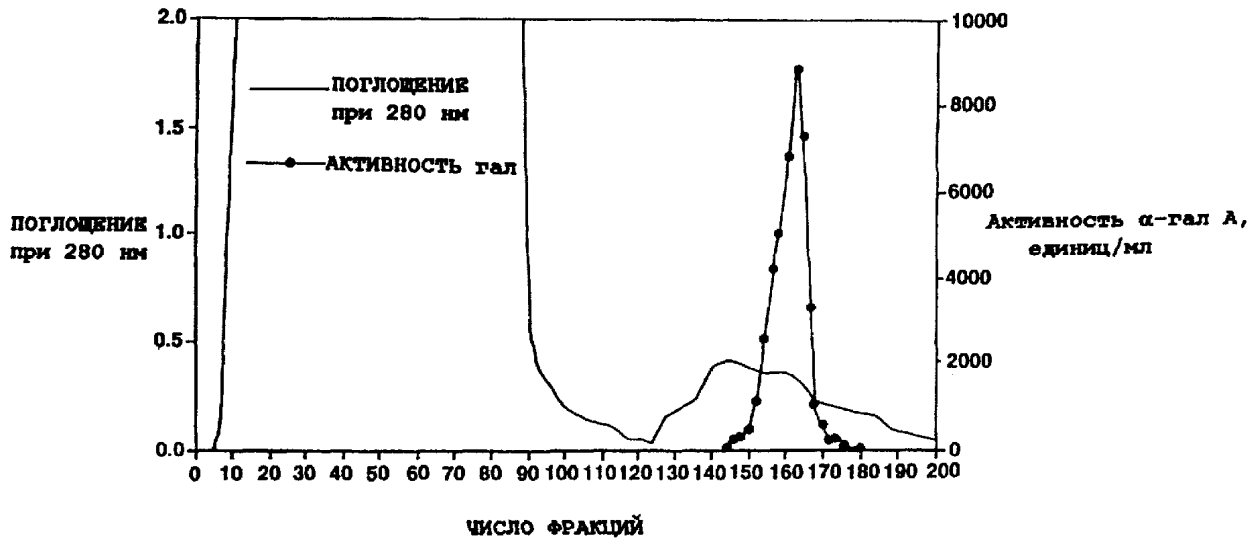
ФИГ. 4



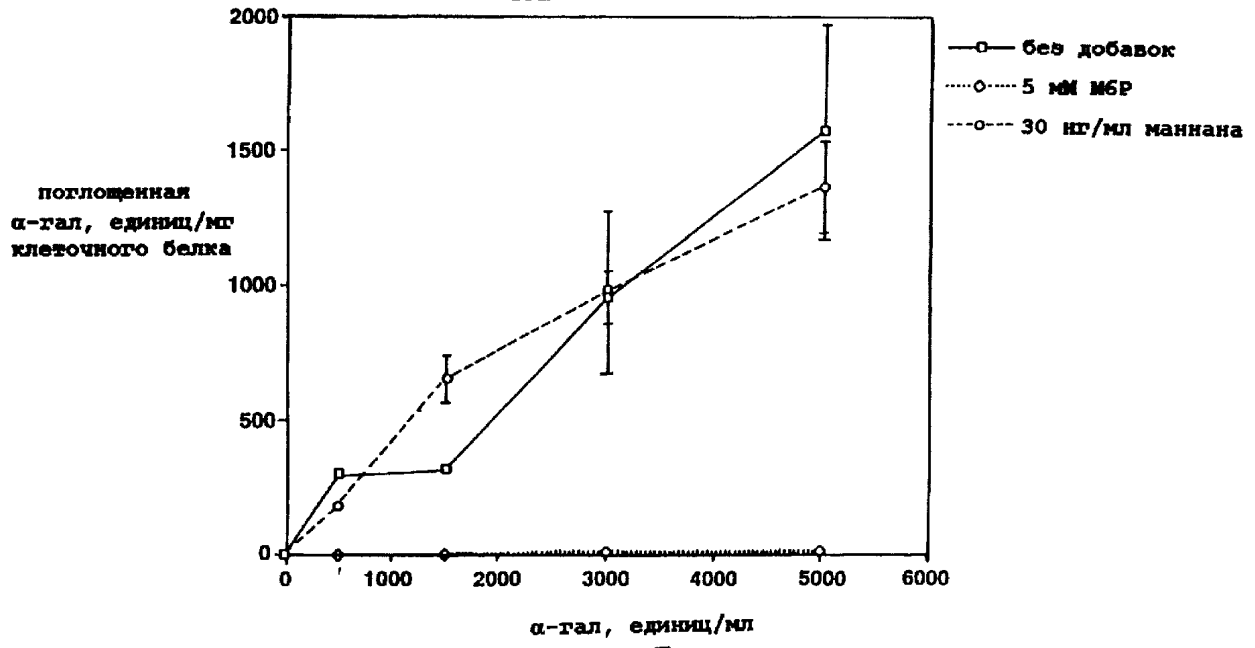
ФИГ. 5

RU 2179034 C2

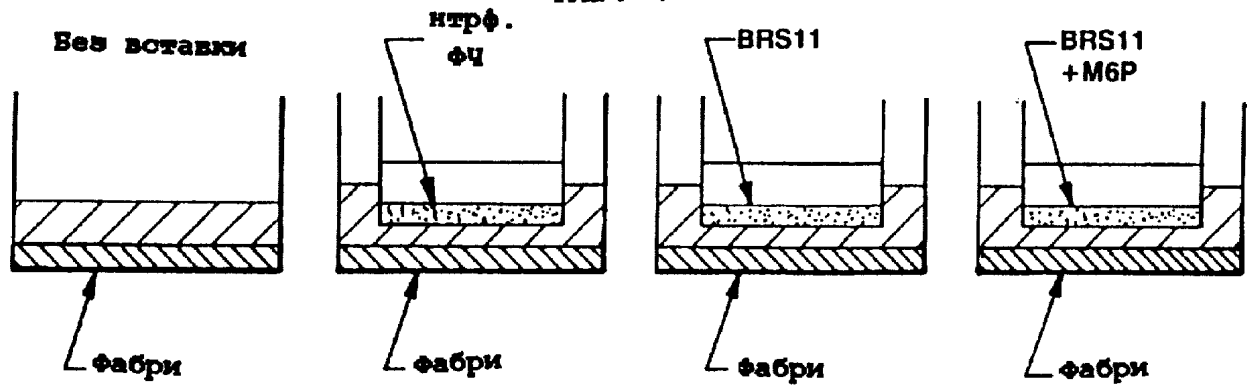
RU 2179034 C2



ФИГ. 6



ФИГ. 7



ФИГ. 8

RU 2179034 C2

RU 2179034 C2

Leu	Asp	Asn	Gly	Leu	Ala	Arg	Thr	Pro	Thr	Met	Gly
Trp	Leu	His	Trp	Glu	Arg	Phe	Met	Cys	Asn	Leu	Asp
Cys	Gln	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Cys	Ile	Ser	Glu	Lys
Leu	Phe	Met	Glu	Met	Ala	Glu	Leu	Met	Val	Ser	Glu
Gly	Trp	Lys	Asp	Ala	Gly	Tyr	Glu	Tyr	Leu	Cys	Ile
Asp	Asp	Cys	Trp	Met	Ala	Pro	Gln	Arg	Asp	Ser	Glu
Gly	Arg	Leu	Gln	Ala	Asp	Pro	Gln	Arg	Phe	Pro	His
Gly	Ile	Arg	Gln	Leu	Ala	Asn	Tyr	Val	His	Ser	Lys
Gly	Leu	Lys	Leu	Gly	Ile	Tyr	Ala	Asp	Val	Gly	Asn
Lys	Thr	Cys	Ala	Gly	Phe	Pro	Gly	Ser	Phe	Gly	Tyr
Tyr	Asp	Ile	Asp	Ala	Gln	Thr	Phe	Ala	Asp	Trp	Gly
Val	Asp	Leu	Leu	Lys	Phe	Asp	Gly	Cys	Tyr	Cys	Asp
Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Tyr	Lys	His	Met
Ser	Leu	Ala	Leu	Asn	Arg	Thr	Gly	Arg	Ser	Ile	Val
Tyr	Ser	Cys	Glu	Trp	Pro	Leu	Tyr	Met	Trp	Pro	Phe
Gln	Lys	Pro	Asn	Tyr	Thr	Glu	Ile	Arg	Gln	Tyr	Cys
Asn	His	Trp	Arg	Asn	Phe	Ala	Asp	Ile	Asp	Asp	Ser
Trp	Lys	Ser	Ile	Lys	Ser	Ile	Leu	Asp	Trp	Thr	Ser
Phe	Asn	Gln	Glu	Arg	Ile	Val	Asp	Val	Ala	Gly	Pro
Gly	Gly	Trp	Asn	Asp	Pro	Asp	Met	Leu	Val	Ile	Gly
Asn	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Asn	Gln	Gln	Val	Thr	Gln
Met	Ala	Leu	Trp	Ala	Ile	Met	Ala	Ala	Pro	Leu	Phe
Met	Ser	Asn	Asp	Leu	Arg	His	Ile	Ser	Pro	Gln	Ala
Lys	Ala	Leu	Leu	Gln	Asp	Lys	Asp	Val	Ile	Ala	Ile
Asn	Gln	Asp	Pro	Leu	Gly	Lys	Gln	Gly	Tyr	Gln	Leu
Arg	Gln	Gly	Asp	Asn	Phe	Glu	Val	Trp	Glu	Arg	Pro
Leu	Ser	Gly	Leu	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Met	Ile	Asn
Arg	Gln	Glu	Ile	Gly	Gly	Pro	Arg	Ser	Tyr	Thr	Ile
Ala	Val	Ala	Ser	Leu	Gly	Lys	Gly	Val	Ala	Cys	Asn
Pro	Ala	Cys	Phe	Ile	Thr	Gln	Leu	Leu	Pro	Val	Lys
Arg	Lys	Leu	Gly	Phe	Tyr	Glu	Trp	Thr	Ser	Arg	Leu
Arg	Ser	His	Ile	Asn	Pro	Thr	Gly	Thr	Val	Leu	Leu
Gln	Leu	Glu	Asn	Thr	Met	Gln	Met	Ser	Leu	Lys	Asp
Leu	Leu										

ФИГ. 9

RU 2179034 C2

RU 2179034 C2

ATGGCTACAG GTAAGCGCCC CTAAAATCCC TTTGGGCACA

ATGTGTCCTG AGGGGAGAGG CAGCGACCTG TAGATGGGAC

GGGGGCACTA ACCCTCAGGT TTGGGGCTTC TGAATGTGAG

TATCGCCATG TAAGCCCAGT ATTTGGCCAA TCTCAGAAAG

CTCCTGGTCC CTGGAGGGAT GGAGAGAGAA AAACAAACAG

CTCCTGGAGC AGGGAGAGTG CTGGCCTCTT GCTCTCCGGC

TCCCTCTGTT GCCCTCTGGT TCTCCCCAG GCTCCCCGAC

GTCCCTGCTC CTGGCTTTTG GCCTGCTCTG CCTGCCCTGG

CTTCAAGAGG GCAGTGCC

ФИГ. 10

ATGGCTACAG GCTCCCCGAC GTCCCTGCTC CTGGCTTTTG

GCCTGCTCTG CCTGCCCTGG CTTCAAGAGG GCAGTGCC

ФИГ. 11

Met	Ala	Thr	Gly	Ser	Arg	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala
Phe	Gly	Leu	Leu	Cys	Leu	Pro	Trp	Leu	Gln	Glu	Gly
Ser	Ala										

ФИГ. 12

RU 2179034 C2

RU 2179034 C2

1 CTGGACAATG GATTGGCAAG GACGCCTACC ATGGGCTGGC TGCACTGGGA GCGCTTCATG
 61 TGCAACCTTG ACTGCCAGGA AGAGCCAGAT TCCTGCATCA GTGAGAAGCT CTTCATGGAG
 121 ATGGCAGAGC TCATGGTCTC AGAAGGCTGG AAGGATGCAG GTTATGAGTA CCTCTGCATT
 181 GATGACTGTT GGATGGCTCC CCAAAGAGAT TCAGAAGGCA GACTTCAGGC AGACCCCTCAG
 241 CGCTTTCCTC ATGGGATTCG CCAGCTAGCT AATTATGTTT ACAGCAAAGG ACTGAAGCTA
 301 GGGATTTATG CAGATGTTGG AAATAAAACC TGCCGAGGCT TCCCTGGGAG TTTTGGATAC
 361 TACGACATTG ATGCCCAGAC CTTTGCTGAC TGGGGAGTAG ATCTGCTAAA ATTTGATGGT
 421 TGTTACTGTG ACAGTTTGGG AAATTTGGCA GATGGTTATA AGCACATGTC CTGGCCCTG
 481 AATAGGACTG GCAGAAGCAT TGTGTA CTCC TGTGAGTGGC CTCTTTATAT GTGGCCCTTT
 541 CAAAAGCCCA ATTATACAGA AATCCGACAG TACTGCAATC ACTGGCGAAA TTTTGCTGAC
 601 ATTGATGATT CCTGGAAAAG TATAAAGAGT ATCTTGGACT GGACATCTTT TAACCAGGAG
 661 AGAATTGTTG ATGTTGCTGG ACCAGGGGGT TGGAAATGACC CAGATATGTT AGTGATTGGC
 721 AACTTTGGCC TCAGCTGGAA TCAGCAAGTA ACTCAGATGG CCCTCTGGGC TATCATGGCT
 781 GCTCCTTTAT TCATGTCTAA TGACCTCCGA CACATCAGCC CTCAAGCCAA AGCTCTCCTT
 841 CAGGATAAGG ACGTAATTGC CATCAATCAG GACCCCTTGG GCAAGCAAGG GTACCAGCTT
 901 AGACAGGGAG ACAACTTTGA AGTGTGGGAA CGACCTCTCT CAGGCTTAGC CTGGGCTGTA
 961 GCTATGATAA ACCGGCAGGA GATTGGTGGG CCTCGCTCTT ATACCATCGC AGTTGCTTCC
 1021 CTGGGTAAAG GAGTGGCCTG TAATCCTGCC TGCTTCATCA CACAGCTCCT CCCTGTGAAA
 1081 AGGAAGCTAG GGTTCATGA ATGGACTTCA AGGTTAAGAA GTCACATAAA TCCCACAGGC
 1141 ACTGTTTTGC TTCAGCTAGA AAATACAATG CAGATGTCAT TAAAAGACTT ACTTTAA

Фиг. 13

RU 2179034 C2

RU 2179034 C2